

**Funktionelle Charakterisierung der  
Phosphatidylinositol3-Kinase CaVps34p aus der  
humanpathogenen Hefe *Candida albicans* und ihre  
Bedeutung für die Virulenz**

Dissertation  
zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Diplom-Biologin Astrid Bruckmann  
geboren am 23.06.1972 in Blankenburg/Harz



Hyphen von *Candida albicans*  
im Nierengewebe einer Maus

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Die humanpathogene Hefe <i>Candida albicans</i> . . . . .	1
1.2 Virulenzfaktoren von <i>C. albicans</i> . . . . .	2
1.2.1 Dimorphismus und phänotypisches “switching” . . . . .	3
1.2.2 Adhäsion . . . . .	6
1.3 Signaltransduktion über Phosphoinositide . . . . .	8
1.3.1 Vps34p-abhängige Signaltransduktion vesikelvermittelter intrazellulärer Transportprozesse in <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	10
1.3.2 Vesikeltransport und Phosphoinositid-abhängige Signaltransduktion in <i>C. albicans</i> . . . . .	13
1.4 Zielstellung der Arbeit . . . . .	15
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>16</b>
2.1 Stammhaltung und Kultivierung . . . . .	16
2.1.1 <i>Escherichia coli</i> -Stämme . . . . .	16
2.1.2 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> -Stämme . . . . .	16
2.1.3 <i>Candida albicans</i> -Stämme . . . . .	16
2.1.4 Weitere Pilzstämme . . . . .	17
2.1.5 Nährmedien . . . . .	17
2.1.6 Bestimmung der Wachstumsraten verschiedener <i>C. albicans</i> -Stämme	18
2.1.7 Untersuchung des hyphalen Wachstums von <i>C. albicans</i> . . . . .	18
2.1.8 Untersuchungen zur Temperatur- und Osmosensitivität von <i>C. albicans</i> -Stämmen . . . . .	18
2.2 Nukleinsäurearbeiten . . . . .	19
2.2.1 Primer und Sonden . . . . .	19
2.2.2 Plasmide . . . . .	20
2.2.3 Polymerasekettenreaktion . . . . .	21
2.2.4 DNA-Sequenzierung . . . . .	21
2.2.5 Restriktionsreaktionen . . . . .	22
2.2.6 DNA-modifizierende Enzymreaktionen . . . . .	22
2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen . . . . .	23
2.2.8 Ligationsreaktionen . . . . .	24
2.2.9 Minipräparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i> . . . . .	24
2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Anionenaustausch-Säulen	24
2.2.11 Plasmidisolierung aus <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	25
2.2.12 Isolierung chromosomaler DNA aus <i>C. albicans</i> . . . . .	25

2.2.13	Isolierung von RNA aus <i>C. albicans</i> . . . . .	26
2.2.14	Radioaktive Markierung von Sonden-DNA . . . . .	27
2.2.15	Southern-Analyse . . . . .	27
2.2.16	Koloniehybridisierung . . . . .	28
2.2.17	Northern-Analyse . . . . .	28
2.3	Transformation . . . . .	29
2.3.1	Transformation von <i>E. coli</i> . . . . .	29
2.3.2	Transformation von <i>S. cerevisiae</i> . . . . .	30
2.3.3	Transformation von <i>C. albicans</i> . . . . .	30
2.4	Analyse von Proteinen . . . . .	31
2.4.1	Herstellung von Lysaten aus Hefen . . . . .	31
2.4.2	Heterologe Expression von CaVps34p in <i>E. coli</i> . . . . .	31
2.4.3	Westernblot-Analyse zum Nachweis spezifischer Proteine . . . . .	32
2.4.4	Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität und Bestimmung der Substratspezifität von CaVps34p . . . . .	33
2.4.5	Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität in Lysaten von <i>C. albicans</i> . . . . .	33
2.4.6	Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p . . . . .	33
2.4.7	Bestimmung der Gesamtaktivität der Carboxypeptidase Y in <i>C. albicans</i> -Stämmen . . . . .	34
2.5	Morphologische Untersuchung von <i>C. albicans</i> -Stämmen . . . . .	34
2.5.1	Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie . . . . .	34
2.5.2	Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie . . . . .	35
2.5.3	Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie . . . . .	35
2.6	Untersuchung der Adhäsion von <i>C. albicans</i> an Fibroblasten . . . . .	36
2.7	Untersuchung der Virulenz von <i>C. albicans</i> im Tiermodell . . . . .	37
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>38</b>
3.1	Genomische Organisation von <i>CaVPS34</i> . . . . .	38
3.2	Nachweis von <i>CaVPS34</i> -homologen Sequenzen in weiteren Pilzstämmen . . . . .	39
3.3	Analyse der Transkription von <i>CaVPS34</i> unter verschiedenen Wachstumsbedingungen . . . . .	41
3.3.1	Transkriptregulation von <i>CaVPS34</i> während der Morphogenese . . . . .	41
3.3.2	Wachstumsabhängige Regulation der <i>CaVPS34</i> -Transkription . . . . .	44
3.4	Heterologe Expression von CaVps34p in <i>E. coli</i> . . . . .	45
3.5	Enzymaktivitäten des rekombinanten Proteins . . . . .	46
3.5.1	Lipidkinaseaktivität von CaVps34p . . . . .	46
3.5.2	Substratspezifität von CaVps34p . . . . .	48
3.5.3	Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p . . . . .	49
3.5.4	PI3-Kinase-Aktivität in Proteinextrakten von <i>C. albicans</i> . . . . .	50
3.6	Komplementationsversuche mit <i>S. cerevisiae vps34</i> - und <i>vps15</i> -Mutanten . . . . .	51



3.6.1	Versuch der Komplementation einer <i>S. cerevisiae vps34</i> -Mutante durch <i>CaVPS34</i> unter der Kontrolle seines eigenen Promotors . . .	51
3.6.2	Komplementation einer <i>S. cerevisiae vps34</i> -Mutante durch Überexpression von <i>CaVPS34</i> . . . . .	53
3.6.3	Suppression des Wachstumsdefekts einer <i>S. cerevisiae vps15</i> -Mutante durch Überexpression von <i>CaVPS34</i> . . . . .	54
3.7	Disruption und Reintegration von <i>CaVPS34</i> im <i>C. albicans</i> -Stamm CAI4 .	56
3.7.1	Konstruktion der Disruptionskassette . . . . .	56
3.7.2	Sequentielle Disruption beider <i>CaVPS34</i> -Allele in <i>C. albicans</i> CAI4	57
3.7.3	Konstruktion der Reintegrationskassette . . . . .	59
3.7.4	Reintegration von <i>CaVPS34</i> in das Genom der <i>CaVPS34</i> -Nullmutante . . . . .	59
3.8	Charakterisierung der <i>CaVPS34</i> -disruptierten Stämme . . . . .	60
3.8.1	Einfluß der Disruption von <i>CaVPS34</i> auf die Vakuolenmorphologie	60
3.8.2	Strukturelle Besonderheiten der Zelloberfläche der <i>CaVPS34</i> -Nullmutante . . . . .	61
3.8.3	Ultrastrukturelle Merkmale der <i>CaVPS34</i> -Nullmutante . . . . .	62
3.8.4	Lipidkinaseaktivität in <i>C. albicans</i> nach Disruption von <i>CaVPS34</i> .	64
3.8.5	Wachstumsanalyse der <i>CaVPS34</i> -disruptierten <i>C. albicans</i> -Stämme	64
3.8.6	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf die Sensitivität gegenüber Temperatur- und Osmostreß . . . . .	66
3.8.7	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf die Aktivität der Carboxypeptidase Y . .	68
3.8.8	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf den endocytischen Vesikeltransport . . .	69
3.8.9	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf die Bildung von Hyphen unter verschiedenen Induktionsbedingungen . . . . .	71
3.8.10	Auswirkung der Disruption von <i>CaVPS34</i> auf die Adhäsion an Maus-Fibroblastenzellen . . . . .	75
3.8.11	Bedeutung von <i>CaVPS34</i> für die Virulenz von <i>C. albicans</i> im embryonierten Hühnerei-Modell . . . . .	77
3.8.12	Bedeutung von <i>CaVPS34</i> für die Virulenz von <i>C. albicans</i> im Mausmodell einer systemischen Candidosis . . . . .	78
3.9	Identifizierung einer zu <i>TOR1/TOR2</i> aus <i>S. cerevisiae</i> homologen Sequenz in <i>C. albicans</i> . . . . .	81
3.10	Suppression des Wachstumsdefektes einer <i>S. cerevisiae tor2<sup>ts</sup></i> -Mutante durch Überexpression von <i>CaVPS34</i> . . . . .	82
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>85</b>
4.1	<i>CaVps34p</i> ist eine funktionelle PI3-Kinase . . . . .	85
4.1.1	Funktionelle Homologie von <i>CaVps34p</i> und <i>ScVps34p</i> . . . . .	85
4.1.2	<i>CaVps34p</i> besitzt <i>in vitro</i> PI3-Kinase- und Proteinkinase-Aktivität	87
4.1.3	PI3-Kinase-Aktivität in <i>C. albicans</i> -Proteinextrakten . . . . .	88

4.2	Zelluläre Funktionen von <i>CaVPS34</i> . . . . .	89
4.2.1	Rolle von <i>CaVPS34</i> bei der Aufrechterhaltung der Vakuolenmorphologie und -funktion . . . . .	89
4.2.2	Rolle von <i>CaVPS34</i> bei Endocytoseprozessen . . . . .	94
4.2.3	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf das Hyphenwachstum . . . . .	95
4.2.4	Einfluß von <i>CaVPS34</i> auf die Adhäsion an Fibroblastenzellen . . . .	97
4.3	Einfluß der Disruption von <i>CaVPS34</i> auf die Virulenz von <i>C. albicans</i> im Tiermodell . . . . .	97
4.4	<i>CaVPS34</i> – ein mögliches Target zur Suche nach antifungal wirksamen Substanzen . . . . .	98
4.5	Funktionelle Verbindung zwischen <i>CaVPS34</i> und <i>ScTOR2</i> : Beeinflußt <i>VPS34</i> die <i>TOR2</i> -abhängige Kontrolle der Aktinzytoskelettorganisation? . . . . .	99
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>102</b>
	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>103</b>
	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>122</b>

# 1. Einleitung

## 1.1 Die humanpathogene Hefe *Candida albicans*

Pilzinfektionen haben in den letzten Jahren weltweit deutlich zugenommen (Pfaller *et al.*, 1996). Dies steht vor allem im Zusammenhang mit der steigenden Zahl von Patienten mit einem geschwächten Immunsystem. Unter den als humanpathogen bekannten Pilzspezies wird *Candida albicans* am häufigsten als Erreger mukokutaner oder aber tief lokalisierter Mykosen isoliert. *C. albicans* ist ein opportunistisches Pathogen, welches normalerweise als harmloser Kommensale der Schleimhäute des Menschen existiert. Etwa 30%-50% der Gesunden tragen *C. albicans* oral bzw. gastrointestinal (McCullough *et al.*, 1996). Zu einer Infektion kommt es jedoch erst dann, wenn eine Prädisposition durch lokale oder systemische Faktoren vorliegt. Lokale Oberflächenmykosen sind in der Regel gut therapierbar. Im immunkompromittierten Organismus kann es dagegen zu tiefergehenden und systemischen Infektionen kommen, die in vielen Fällen lebensbedrohlich sind. Für die Manifestierung dieser systemischen Organmykosen ist die Beeinträchtigung der zellulären Immunabwehr durch verschiedene Faktoren ausschlaggebend. *Candida*-Infektionen werden z.B. besonders häufig bei AIDS-Patienten diagnostiziert. So entwickeln über 90% aller HIV-Infizierten eine orale Candidosis (Greenspan, 1994). Aber auch die Fortschritte in Transplantationsmedizin und Chemotherapie bewirken durch den Einsatz von Immunsuppressiva und Zytostatika ein aggressiveres Eingreifen in den menschlichen Organismus und bereiten damit den Boden für Candidämien. Zu den prädisponierenden Faktoren gehören weiterhin eine längerfristige Antibiotikatherapie, Neutropenie, lymphoide Malignome, andauernde Kortikoidsteroidtherapie, intravenöse Katheter und Diabetes mellitus. Auch Neugeborene, insbesondere aber Frühgeborene, weisen wegen ihrer unreifen Immunabwehr ein erhöhtes Krankheitsrisiko auf. Trotz der bestehenden Behandlungsmöglichkeiten mit modernen Antimykotika liegt die Lethalitätsrate disseminierter *Candida*-Infektionen bei über 50%. Allein in Deutschland muß deshalb von etwa 10 000 Todesfällen pro Jahr ausgegangen werden (Morschhäuser *et al.*, 1997).

Taxonomisch wird *C. albicans* aufgrund eines bisher nicht nachgewiesenen sexuellen Vermehrungszyklus bei den Deuteromyceten (Fungi imperfecti) eingeordnet. Dabei steht *C. albicans* in naher Verwandtschaft zu den Ascomyceten, wobei insbesondere zu *Saccharomyces cerevisiae* auf molekularer Ebene eine starke Ähnlichkeit besteht (Odds, 1988, Hendriks, 1991). Das Genom von *C. albicans* ist diploid und umfaßt pro haploidem Genom 15,5 Mbp verteilt auf acht Chromosomen (Riggsby *et al.*, 1982, Doi *et al.*, 1992, Chu *et al.*, 1993). Für einige Gen-Loci existiert eine natürliche Heterozygotie (Whelan und Magee, 1981, Whelan und Soll, 1982). Häufige Umordnungen im Genom (Rutschenko-Bulgac *et al.*, 1994, Janbon *et al.*, 1998) erhöhen die Variabilität und dienen möglicherweise zur Kompensation der fehlenden sexuellen Rekombinationsprozesse. Aufgrund der Identifizie-

rung eines Mating-Type-ähnlichen Locus in *C. albicans* (Hull *et al.*, 1999) wird in jüngster Zeit wieder besonders stark über eine sexuelle Phase spekuliert.

Molekulargenetische Analysen in *C. albicans* werden aufgrund des diploiden Genoms und des asexuellen Lebenszyklus der Hefe erschwert (Scherer und Magee, 1990, Pla *et al.*, 1996). So reicht z.B. die Erzeugung von heterozygoten Mutanten häufig nicht aus, um einen Phänotyp auszuprägen. Homozygote Mutanten herzustellen, stellt jedoch einen komplizierteren und zeitaufwendigeren Vorgang dar. Ein weiteres Hindernis für die Anwendung bestimmter molekulargenetischer Techniken stellt die Divergenz in der Codon-Nutzung zwischen den relativ nahe verwandten Hefen *S. cerevisiae* und *C. albicans* dar (Lloyd and Sharp, 1992). Während das Codon CUG in *S. cerevisiae* und anderen Organismen die Aminosäure Leucin kodiert, wird es in *C. albicans* in Serin translatiert (Leuker und Ernst, 1994, Santos and Tuite, 1995), wodurch beispielsweise die Expression von heterologen Reportergenen erschwert wird.

Durch den weitverbreiteten Gebrauch einer begrenzten Zahl etablierter Antimykotika (Polyene, Azole, Fluoropyrimidine) kommt es bei der Behandlung von Candidosen zunehmend zu einer Resistenzentwicklung (Tuite, 1996, Morschhäuser *et al.*, 1997). Probleme bei der Therapie mit diesen Antimykotika bereiten außerdem die zum Teil geringe Spezifität, eingeschränkte Wirksamkeit, schlechte Pharmakokinetik sowie die zu hohe Toxizität (Bastert und Korting, 1999). Zur wirkungsvollen Behandlung von Mykosen ist deshalb ein erweitertes Wirkstoffarsenal wünschenswert. Der Schlüssel zur Entwicklung neuer Medikamente für die antifungale Therapie liegt dabei in der Identifizierung und Charakterisierung neuer Wirkstoff-Targets.

Ein möglicher Angriffspunkt antifungal Substanzen ist die gezielte Inhibierung von Virulenzfaktoren (Perfect, 1996, Georgopapadakou und Walsh, 1996). Der Begriff Virulenz wird in Bezug auf pathogene Pilze relativ breit definiert. Dabei wird das Virulenzkonzept der Fähigkeit des Mikroorganismus, bei Überwindung der Wirtsabwehr im Wirtsorganismus eine Krankheit auszulösen, um die Fähigkeit des Pilzes, im Wirtsorganismus zu wachsen und zu überleben, erweitert (Perfect, 1996). Die Virulenz eines pathogenen Pilzstammes wird als die Kombination verschiedener Virulenzdeterminanten angesehen, wobei die Expression eines einzelnen Virulenzgens nicht ausreicht, sondern ein kritischer Teil aller Virulenzfaktoren zusammenwirken muß, um den Virulenzphänotyp auszuprägen. Diese Kombination kann zwischen verschiedenen Stämmen variieren (Cutler, 1991).

## 1.2 Virulenzfaktoren von *C. albicans*

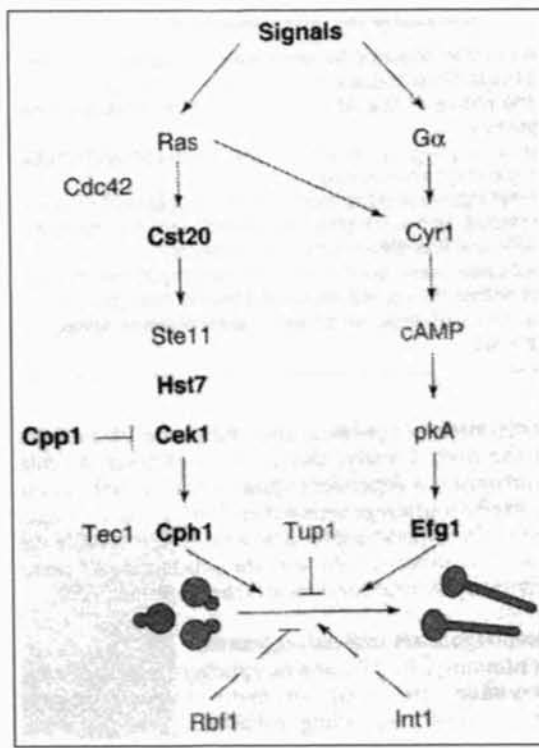
Derzeitige Erkenntnisse legen nahe, daß die Virulenz von *C. albicans* von einer Reihe verschiedener Faktoren abhängt (Cutler, 1991, Odds, 1994). Darunter befinden sich z.B. die Fähigkeit zum Wechsel zwischen verschiedenen morphogenetischen Formen, die Adhärenz an Epithelien und Endothelien des Wirts sowie die Sekretion von Proteinasen und Phospholipasen (Gale *et al.*, 1998, Lo *et al.*, 1997, Hube *et al.*, 1994, Ibrahim *et al.*, 1995). Während eine Reihe von Virulenzfaktoren von *C. albicans* charakterisiert wurden, konn-

te der Mechanismus, welcher den opportunistischen Pilz dazu befähigt, sein pathogenes Potential zu entfalten, noch nicht aufgeklärt werden. Die Virulenz von *C. albicans* läßt sich aber sehr wahrscheinlich nur durch das koordinierte Wirken verschiedener Faktoren in einem sequentiellen und kooperativen Prozeß erklären. Gegenwärtigen Vorstellungen zufolge werden folgende Infektionsstadien einer systemischen Candidosis unterschieden: 1. Kolonisation und Adhäsion von Epithelien, 2. Epithelpenetration, 3. Gefäßinvasion und Dissemination, 4. Endotheladhäsion und Gewebepenetration (Müller *et al.*, 1999, modifiziert nach Odds, 1994). Die einzelnen Virulenzfaktoren können dabei in den verschiedenen Infektionsstadien von unterschiedlicher Bedeutung sein und in verschiedener Weise zusammenwirken.

### 1.2.1 Dimorphismus und phänotypisches “switching”

Von großer Bedeutung für die Virulenz von *C. albicans* ist die Fähigkeit des Pilzes zum Wechsel zwischen verschiedenen Wachstumsformen (Odds, 1988, Cutler, 1991). Das Wachstum von *C. albicans* entweder als unizelluläre Hefe oder aber in einer filamentösen Form wird als Dimorphismus bezeichnet (Shepherd, 1988). Die sogenannten Blastosporen oder Blastokonidien der Hefeform sind runde bis ovale Zellen, welche sich durch Sprossung vermehren. Ausgelöst durch bestimmte Umweltfaktoren wie Temperatur, pH-Wert oder Komponenten des Nährmediums (z.B. Serum, N-Acetylglucosamin, Prolin) sowie auf definierten Mangelmedien (z.B. “Spider”-Medium) kommt es zum filamentösen Wachstum (Odds, 1988, Liu *et al.*, 1994). Hier lassen sich zwei Formen unterscheiden: echte Hyphen und Pseudohyphen. Beide Wachstumsformen zeigen äußerlich ein ähnliches Bild und können zur Ausbildung von Mycelien führen. Echte Hyphen entstehen durch das Auswachsen eines zylindrischen Schlauches aus einer Mutterzelle. Nachdem der Keimschlauch eine bestimmte Länge erreicht hat, wird ein senkrecht zur Zellwand stehendes Septum differenziert. Fortgesetztes apikales Wachstum und Septenbildung führen schließlich zur Entstehung sehr langer Hyphen, wobei sich auch seitliche Verzweigungen bilden können. Durch Poren in den Septen bleibt die Verbindung der Zellen untereinander erhalten. Schließlich kann *C. albicans* durch die Abschnürung von Blastosporen aus Hyphenzellen wieder zum hefigen Wachstum übergehen. Pseudohyphen resultieren dagegen aus langgestreckten Blastosporen, welche sich durch Sprossung vermehren. Im Gegensatz zum normalen Wachstum der Blastosporen bleibt die Tochterzelle jedoch mit der Mutterzelle verbunden, wodurch es zur Bildung von Zellketten kommt.

Auch die apathogene Hefe *S. cerevisiae* geht unter bestimmten Bedingungen (feste Stickstoffmangelmedien) zu filamentösem Wachstum über (Gimeno *et al.*, 1992). Allerdings beschränkt sich dieses auf die Differenzierung von Pseudohyphen. Nach derzeitigen Vorstellungen existieren in *S. cerevisiae* mindestens zwei unabhängige Signalwege zur Pseudohyphenbildung (Madhani und Fink, 1998). Eine der beiden Signalkaskaden beinhaltet Elemente der in die Pheromonantwort haploider *S. cerevisiae*-Stämme involvierten Mitogen Activated Protein (MAP)-Kinase-Kaskade. Dabei handelt es sich um die sukzessive akti-



**Abb. 1.1: Signaltransduktionswege für filamentöses Wachstum in *C. albicans*.** (aus: Brown und Gow, 1999). pkA: Proteinkinase A

vierten Proteinkinasen Ste20p, Ste11p, Ste7p sowie um den durch die MAP-Kinase Kss1p aktivierten Transkriptionsfaktor Ste12p. Ein zweiter, unabhängig von der MAP-Kinase-Kaskade wirkender Signaltransduktionsweg verläuft über cAMP und die Proteinkinase A (PKA) (Robertson und Fink, 1998).

Molekulare Studien des Dimorphismus in *C. albicans* haben ebenfalls zur Identifizierung einer Reihe von Genen geführt, welche die Hyphenmorphogenese regulieren (Abb. 1.1). Obwohl die Signale, welche in *S. cerevisiae* und *C. albicans* filamentöses Wachstum auslösen, verschieden sind, zeigen die identifizierten *C. albicans*-Gene Homologien zu den Komponenten der entsprechenden Signaltransduktionswege in *S. cerevisiae* (Leberer et al., 1996, Köhler und Fink, 1996, Csank et al., 1998). Die Genprodukte zweier Gene, *CPH1* (Candida Pseudohyphal Regulator) (Liu et al., 1994) und *EFG1* (Enhanced Filamentous Growth) (Stoldt et al., 1997), sind als Transkriptionsfaktoren bei der Regulation der Hyphenbildung von zentraler Bedeutung. Dementsprechend führt die Inaktivierung von Cph1p und Efg1p zur Blockade des hyphalen Wachstums (Lo et al., 1997). Bezeichnenderweise zeigt eine *CPH1/EFG1*-Doppelmutante gleichzeitig eine stark verringerte Virulenz im Maus-Candidosis-Modell (Lo et al., 1997). Der Transkriptionsfaktor Cph1p ist zu *S. cerevisiae* Ste12p homolog. Seine Aktivierung erfolgt über die in sequentieller Abfolge agierenden Proteinkinasen Cst20p, Hst7p und Cek1p, welche zu Ste20p, Ste7p und Kss1p aus *S. cerevisiae* homolog sind (Abb. 1.1). Durch die Phosphatase Cpp1p wird diese MAP-Kinase-Kaskade negativ reguliert, wobei auch hier Homologie zu einer entsprechenden Phosphatase (Msg5p) aus *S. cerevisiae* besteht (Csank et al., 1997). Efg1p ist neben Cph1p der zweite Transkriptionsfaktor in *C. albicans* mit positiver regulatorischer Wir-

kung auf das hyphale Wachstum (Stoldt *et al.*, 1997). Während die Hyphenbildung einer *CPH1*-Nullmutante nur auf bestimmten festen Oberflächen ("Spider"-Medium) gehemmt ist, zeigt eine *EFG1*-Nullmutante unter mehreren verschiedenen Induktionsbedingungen (z.B. in Gegenwart von Serum oder N-Acetylglukosamin sowie auf "Spider"-Medium) ein reduziertes Hyphenwachstum (Liu *et al.*, 1994, Stoldt *et al.*, 1997, Lo *et al.*, 1997, Ernst, 2000). Es ist bisher nicht vollständig sicher, ob Efg1p als "downstream"-Target des cAMP/PKA-Weges angesehen werden kann. Allerdings sprechen einige Befunde deutlich für eine Interaktion der Proteinkinase A (Tpk2p) und Efg1p in *C. albicans* (Sonneborn *et al.*, 2000). Derzeit wird die Existenz eines weiteren Cph1p/Efg1p-unabhängigen Weges zur Bildung von Hyphen diskutiert, welcher unter ganz bestimmten Bedingungen wirksam wird (Riggle *et al.*, 1999, Brown Jr. *et al.*, 1999). Dabei könnte der Transkriptionsfaktor Czflp eine Rolle spielen, da er an der Regulation der Hyphenbildung als Reaktion auf die physische Umgebung beteiligt ist (Brown Jr. *et al.*, 1999). Weitere Transkriptionsfaktoren mit Einfluß auf das Hyphenwachstum von *C. albicans* sind Tup1p und Rbflp (Braun und Johnson, 1997, Ishii *et al.*, 1997). Ihnen wird Repressor-Wirkung zugesprochen, da Nullmutanten ein verstärktes filamentöses Wachstum zeigen.

Bisher ist es noch nicht gelungen, eine Kopplung spezifischer extrazellulärer Signale an die bekannten Signaltransduktionswege in *C. albicans* aufzuzeigen. So wurden trotz der Vielzahl von Signalen, die zur Aktivierung der Hefe-Hyphe-Transition führen können, bisher keine spezifischen Rezeptoren identifiziert. Für die Detektion einiger dieser Signale werden auch intrazelluläre Mechanismen wie bei der Aminosäuremangelantwort in *S. cerevisiae*, die durch eine Akkumulation ungeladener tRNA's induziert wird, in Erwägung gezogen (Brown and Gow, 1999).

Die Fähigkeit zum dimorphen Wachstum erhöht das pathogene Potential von *C. albicans*. Mutanten mit Defekten im dimorphen Wachstum zeigen dementsprechend in Tiermodellen eine reduzierte Virulenz (Lo *et al.*, 1997). Im infizierten Gewebe findet man meist sowohl Hyphen als auch Blastosporen. Während Hyphen eine bessere Adhärenz an Endothelien und Epithelien vermitteln und die Penetration des Gewebes zum Eindringen in tiefere Gewebeschichten ermöglichen (Cutler, 1991, Hostetter, 1996), stellen Blastosporen die Verbreitungseinheiten dar, welche eine schnellere Vermehrung und die Dissemination über den Blutstrom gewährleisten. Hyphen erleichtern nicht nur die Invasion ins Gewebe, sondern können auch die Immunantwort des Wirtsorganismus abwehren, indem sie aus Makrophagenzellen wieder herauswachsen (Vazquez-Torres und Balish, 1997). Außerdem werden weitere Virulenzfaktoren im Zusammenhang mit dem Dimorphismus spezifisch reguliert. So wurde z.B. für die Gene einiger sekretierter Aspartatproteasen (*SAP4-6*, Hube *et al.*, 1994) sowie für bestimmte Adhäsionsproteine (*HWP1*, Staab *et al.*, 1996, *HYR1*, Bailey, 1996, *ALS3*, Hoyer *et al.*, 1998b) eine hyphenspezifische Expression nachgewiesen.

Neben dem Dimorphismus wird auch ein anderer Morphogenese-prozeß, das phänotypische "switching", als Virulenzcharakteristikum diskutiert. Diese spontan auftretende Veränderung der Zell- und Kolonimorphologie ist an die Fähigkeit, Zelloberflächeneigenschaften wie Adhärenz und antigene Strukturen sowie weitere physiologische Parameter

reversibel zu verändern, gekoppelt und erhöht somit die Variabilität von *C. albicans*. Sehr gut untersucht ist das phänotypische “switching” des Stammes WO-1 (Slutsky, 1987, Soll, 1992). Hierbei kommt es zu einem reversiblen Phasenwechsel zwischen einer “white”- und einer “opaque”-Form. Neben den verschiedenen morphologischen Merkmalen gibt es zwischen diesen beiden Formen auch Unterschiede in der Adhäsions- und Kohäsionsfähigkeit (Kennedy *et al.*, 1988), der Sensitivität gegenüber Oxidantien und Neutrophilen sowie Antimykotika (Kolotila und Diamond, 1990, Soll *et al.*, 1993), bei der Sekretion saurer Aspartatproteinasen (Morrow *et al.*, 1992), im Sterol- und Lipidgehalt (Ghannoum *et al.*, 1990), in der Zuckerassimilation (Soll, 1993) und in der Virulenz (Kvaal *et al.*, 1997).

### 1.2.2 Adhäsion

Die Adhäsion von *C. albicans* an Epithelien, Endothelien sowie an die extrazelluläre Matrix (ECM) des Wirtsorganismus ist eine essentielle Voraussetzung für die Besiedlung tieferliegender Gewebeschichten bei der Etablierung einer systemischen Infektion (Calderone und Braun, 1991). *C. albicans* besitzt ein umfangreiches Repertoire an Adhäsionsmolekülen, darunter Glykoproteine, Polysaccharide und Lipide (Chaffin *et al.*, 1998, Fukazawa *et al.*, 1997, Ghannoum *et al.*, 1986). Neben unspezifischen Wechselwirkungen hydrophober Zellwandbestandteile ist die spezifische rezeptorvermittelte Adhäsion von großer Bedeutung für die Kolonisierung der Wirtsgewebe (Calderone und Braun, 1991). Eine solche spezifische Adhäsion wird durch verschiedenartige Interaktionen bestimmter Zelloberflächenmoleküle, der Adhäsine, mit Wirtszellmolekülen ermöglicht (Calderone und Braun, 1991, Hostetter, 1996, Sundstrom, 1999). Dies kann zum einen durch Mannoproteine von *C. albicans* geschehen, deren Polypeptid-Teil die Aminosäuresequenz Arginin-Glycin-Asparaginsäure (RGD) in Glykoproteinen der extrazellulären Matrix der Wirtszelle erkennt. Solche Protein-Protein-Interaktionen vermitteln beispielsweise Integrin-ähnliche Proteine, welche z.B. Fibronectin- und Lamininbestandteile sowie das Komplementfragment iC3b humaner Epithelzellen erkennen können (Klotz *et al.*, 1994, Buochara *et al.*, 1990, Gale *et al.*, 1996, Hostetter, 1996). Das bisher einzige in *C. albicans* identifizierte integrinähnliche Protein  $\alpha$ -Int1p bindet an iC3b-Moleküle der Wirtszelloberfläche (Gale *et al.*, 1996, Hostetter, 1996). Die Untersuchungen an Int1p zeigen auch, daß Oberflächenadhäsine zusätzliche Funktionen erfüllen können (Gale *et al.*, 1998). So beeinflusst Int1p gleichzeitig die Hyphenbildung unter bestimmten Induktionsbedingungen, wobei es möglicherweise als Sensor wirkt. Überdies konnte ein Zusammenhang mit der Virulenz von *C. albicans* festgestellt werden. *INT1*-Nullmutanten zeigten eine verminderte Adhäsion an humane Epithelzellen und waren im Maus-Candidosis-Modell nahezu avirulent (Gale *et al.*, 1998). Daß auch durch Wirtsfaktoren eine Regulation der Adhäsionsvorgänge erfolgt, wurde am Beispiel des Hämoglobins gezeigt, welches die Bindung von *C. albicans* an verschiedene ECM-Proteine (Fibronectin, Laminin, Fibrinogen, Typ IV-Kollagen) verstärkt (Yan *et al.*, 1998). Eine andere Variante der Pathogen-Wirtszell-Interaktion besteht in der Ausbildung lektinähnlicher Bindungen durch Glykoproteine, wobei Kohlenhydratres-



te an der Zelloberfläche erkannt werden. Hierfür wurde beispielsweise ein putatives Lektin von *C. albicans* beschrieben, welches Fucose-Reste auf Blutgruppenantigenen erkennt (Tosh *et al.*, 1992). Umgekehrt kann auch ein Tetramannose-Epitop von *C. albicans* durch Wirtszell-Lektine erkannt werden (Li und Cutler, 1994). Jüngere Untersuchungen haben zur Identifizierung einer weiteren Klasse von Adhäsionsproteinen, der  $\alpha$ -Agglutinin-ähnlichen Proteine, geführt. So wurden z.B. die Adäsine Als1p und Ala1p aus *C. albicans* als Proteine isoliert, die bei Überexpression in der nicht-adhären Hefe *S. cerevisiae* die Adhäsion vermitteln (Fu *et al.*, 1998, Gaur und Klotz, 1997). Sie gehören zu einer Proteinfamilie, der agglutinin-like sequence (ALS)-Familie, in welche bisher drei weitere Vertreter (Als2-4p) eingeordnet werden konnten (Hoyer *et al.*, 1995, Hoyer *et al.*, 1998a, b). Eine wichtige Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit von Adhäsionsproteinen sind Kohlenhydratmodifikationen an diesen Proteinen. Dabei kommt der durch Pmt1p (Protein-Mannosyltransferase) vermittelten O-Glykosylierung und der Mannosylierung durch Mnt1p ( $\alpha$ -1,2-Mannosyltransferase) eine bedeutende Rolle zu (Timpel *et al.*, 1998, Buurman *et al.*, 1998).

Die Ausbildung von Hyphen begünstigt die Adhäsion von *C. albicans* (Cutler, 1991). Als Ursache hierfür wurde angenommen, daß es zu einer unspezifischen Wechselwirkung mit Epithelzellen aufgrund des höheren Anteils an hydrophobem Zellwandmaterial kommt (Odds, 1994). Neuere Befunde belegen, daß vor allem ein unkonventioneller hyphenspezifischer Adhäsionsmechanismus zu einer starken Adhäsion beiträgt (Staab *et al.*, 1999). Ausgelöst wird diese Bindung durch Hwp1p (Hypthal wall protein), ein hyphenspezifisch exprimiertes Glykoprotein (Staab *et al.*, 1999). Dieses  $\alpha$ -Agglutinin-ähnliche Adhäsins ist ein Substrat der Säugerzell-Transglutaminase und ermöglicht so das kovalente “crosslinking” des Pathogens mit der Wirtszelle (Staab *et al.*, 1999). Neben Hwp1p erfüllt auch das hyphenspezifische Zellwandprotein Hyr1p (Hypthally regulated protein) die Kriterien  $\alpha$ -Agglutinin-ähnlicher Proteine und könnte demnach zur Adhäsion beitragen (Bailey *et al.*, 1996). Die Identifizierung der genannten Proteine führte zur Postulierung eines Modells der Adhäsion als Zweistufenprozeß (Sundstrom, 1999). Dabei kommt es durch konventionelle Adhäsine zu einer vorübergehenden Immobilisierung von *C. albicans*-Zellen an Oberflächen. Bei der anschließenden Bildung von Hyphen erfolgt schließlich die stabile Anhaftung an das Wirtsgewebe. Dies geschieht über das “crosslinking” von *C. albicans* Hwp1p mit noch nicht identifizierten Wirtsproteinen durch die Transglutaminase-Aktivität der Wirtszellen (Sundstrom, 1999).

Zu weiteren Virulenzfaktoren, von denen angenommen wird, daß sie vor allem bei der Invasion tieferliegender Gewebeschichten und der Etablierung der Infektion eine Rolle spielen, gehören sekretierte Enzyme. Neben Phospholipasen (Ibrahim *et al.*, 1995), N-Acetylglucosaminidasen (Molloy *et al.*, 1994) und Siderophoren (Sweet und Douglas, 1991) ist die Gruppe der sauren Aspartatproteasen besonders gut untersucht. Diese werden von einer Genfamilie aus bisher zehn Genen (*SAP1-10*) kodiert (Magee *et al.*, 1993, Hube *et al.*, 1994, Hube, pers. Mitteilung). Die Aktivität der sekretierten Aspartatproteasen trägt zur Gewebeschädigung während der Infektion bei (Schaller *et al.*, 1999a) und scheint auch

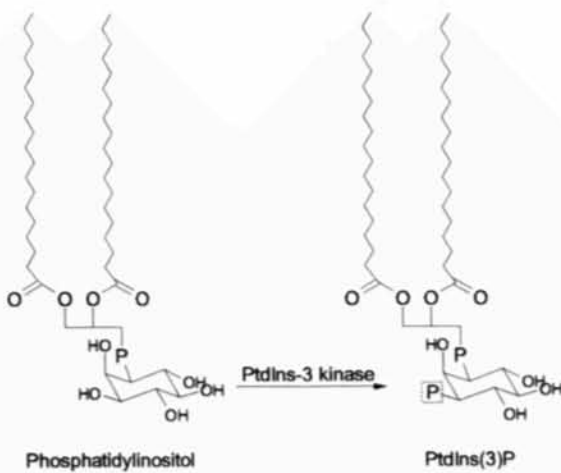
bei Adhäsionsprozessen zwischen *C. albicans* und epithelialen Zellen eine Rolle zu spielen (Watts *et al.*, 1998, Schaller *et al.*, 1999b). N-Acetylglucosaminidasen erhöhen vermutlich die Zugänglichkeit von Wirtszelloberflächen für Adhäsion und Invasion (Matthews, 1994). Auch bei der von *C. albicans* sekretierten Phospholipase B geht man davon aus, daß sie die Penetration durch Schädigung der Wirtszellmembran erleichtert (Leidich *et al.*, 1998).

### 1.3 Signaltransduktion über Phosphoinositide

Signaltransduktionsprozesse, an denen Inositolphospholipide beteiligt sind, stellen einen in eukaryotischen Organismen weitverbreiteten Mechanismus dar. Ein fundamentaler Prozeß der Regulation vieler zellulärer Funktionen ist die durch die Phospholipase C katalysierte Hydrolyse von Phosphatidylinositol-(4,5)-bisphosphat ( $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ ), welche die “second messenger” Inositol-(1,4,5)-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und *sn*-1,2-Diacylglycerol (DAG) produziert (Berridge *et al.*, 1989).  $\text{IP}_3$  führt anschließend zur Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionen aus intrazellulären Speichern, und DAG aktiviert einige Spezies der Proteinkinase C-Familie.

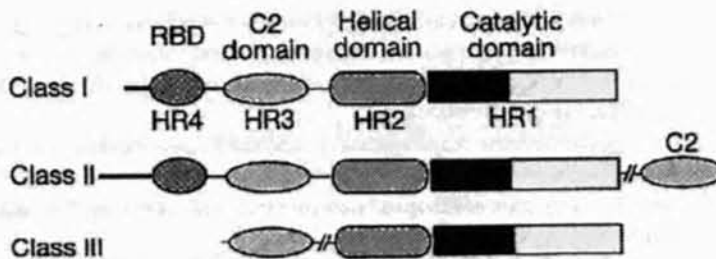
Im Zentrum eines zweiten bedeutenden Signaltransduktionsmechanismus steht die durch Phosphatidylinositol3-Kinasen (PI3-Kinasen) katalysierte Phosphorylierung von  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  unter Bildung des “second messengers” Phosphatidylinositol-(3,4,5)-trisphosphat (Stephens *et al.*, 1991, Toker und Cantley, 1997). PI3-Kinasen können aber auch Phosphatidylinositol (PI) und Phosphatidylinositol4-phosphat ( $\text{PI}(4)\text{P}$ ) in D3-Position des Inositolrings phosphorylieren, wobei die Produkte  $\text{PI}(3)\text{P}$  und  $\text{PI}(3,4)\text{P}_2$  entstehen. Diese besitzen ebenfalls Bedeutung als “second messenger”. Im Gegensatz zum “klassischen” PLC/ $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$ -Pathway unterliegt jedoch keines der 3'-phosphorylierten Phosphoinositide einer Spaltung durch die Phospholipase C (Toker und Cantley, 1997).

PI3-Kinasen sind an einem breiten Spektrum von zellulären Prozessen beteiligt. Dazu gehören die Mitogenese, der Schutz vor Apoptose, die Wachstumsfaktor-Rezeptor-“downregulation”, die Stimulierung der Glukoseaufnahme, die Endocytose, das Rearrangement des Aktinzytoskeletts und der intrazellulärer Vesikeltransport (DeCamilli *et al.*, 1996, Toker und Cantley, 1997). Die Diversität dieser Funktionen korreliert mit der Existenz einer ganzen Familie von PI3-Kinasen, welche auf der Grundlage ihrer Sequenzhomologie, Substratspezifität und regulatorischer Eigenschaften in drei Klassen unterteilt wurden (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997, Vanhaesebroeck und Waterfield, 1999). Zur Klasse I gehören heterodimere PI3-Kinasen aus einer katalytischen Untereinheit von 110-120 kDa und einer 50-100 kDa Adaptor-Untereinheit. Bevorzugtes Substrat dieser PI3-Kinasen scheint *in vivo*  $\text{PI}(4,5)\text{P}_2$  zu sein, wobei *in vitro* auch PI und  $\text{PI}(4)\text{P}$  phosphoryliert werden. Die Aktivierung dieser Kinasen durch extrazelluläre Signale verläuft über Rezeptoren mit intrinsischer Tyrosinkinase-Aktivität, über src-ähnliche Proteintyrosinkinasen oder aber G-Protein gekoppelte Rezeptoren. In die zweite Klasse werden PI3-Kinasen mit einer *in vitro*-Substratspezifität für PI und  $\text{PI}(4)\text{P}$  eingeordnet. Diese Proteine sind 170-210 kDa schwer und weisen eine charakteristische C-terminale C2-Domäne auf. Adaptormoleküle dieser PI3-Kinasen wurden bisher nicht identifiziert. Auch ist über die Funktion



**Abb. 1.2: 3'-Phosphorylierung von Phosphatidylinositol.** PtdIns(3)P: Phosphatidylinositol 3-phosphat (PI(3)P).

und Regulation dieser PI3-Kinasen noch sehr wenig bekannt. Die Klasse III umfaßt PI3-Kinasen, die zu Vps34p (vacuolar protein sorting) aus *S. cerevisiae* homolog sind und ausschließlich PI phosphorylieren (Abb. 1.2). In der Hefe *S. cerevisiae* repräsentiert Vps34p die einzige PI3-Kinase (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Die Aktivität der Klasse III PI3-Kinasen ist vor allem bei der Signaltransduktion intrazellulärer Vesikeltransportprozesse von großer Bedeutung. Zu ihrer Aktivierung benötigen diese Proteine eine als Adaptor-molekül fungierende Serin/Threonin-Proteinkinase. Homologe von VPS34 wurden auch in anderen eukaryotischen Organismen identifiziert, darunter *Schizosaccharomyces pombe*, *Hansenula polymorpha*, *Glycine max*, *Arabidopsis thaliana*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Dictyostelium discoideum*, *Drosophila melanogaster* und Humanzellen (Hong und Verma, 1994, Kiel *et al.*, 1999, Kimura *et al.*, 1995, Linassier *et al.*, 1997, Molendijk und Irvine, 1998, Takegawa *et al.*, 1995, Volinia *et al.*, 1995, Welters *et al.*, 1994, Zhou *et al.*, 1995). In unserer Arbeitsgruppe konnte in der humanpathogenen Hefe *C. albicans* ebenfalls eine VPS34-homologe PI3-Kinase identifiziert werden (Eck *et al.*, im Druck), deren Klonierung und Sequenzierung die Voraussetzung für die vorliegende Arbeit bildete.



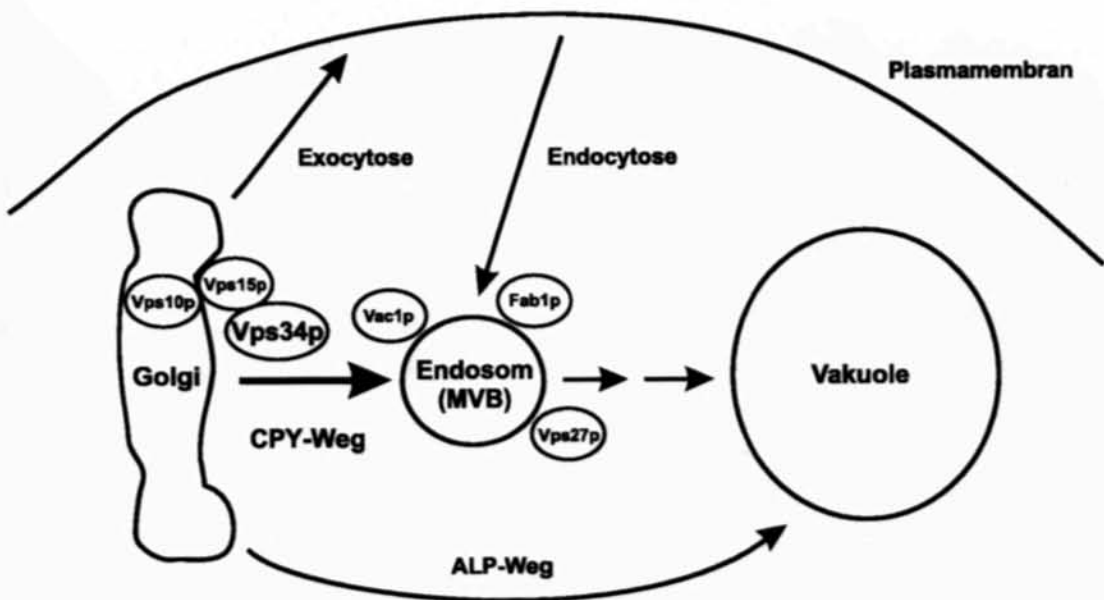
**Abb. 1.3: Domänenorganisation der PI3-Kinase-Klassen.** HR: Homologieregion, RBD: Ras-Bindedomäne. (aus: Walker *et al.*, 1999).

Abbildung 1.3 veranschaulicht konservierte Domänen der PI3-Kinase-Familie. Innerhalb der C-terminalen Kinasedomäne (katalytische Kerndomäne) befinden sich einige hochkonservierte Motive. Dazu gehören bestimmte Aminosäuren, die an ATP-Bindung und Phosphattransfer beteiligt sind, der katalytische Loop und das DFG-Motiv, sowie die Substrat-

bindestelle (Zvelebil *et al.*, 1996, Wymann und Pirola, 1998)(vgl. auch Abb. 1.5). Diese konservierten Motive verdeutlichen die Ähnlichkeit zu Proteinkinasen. Die C-terminale Kinasedomäne (Homologieregion I, HR1) ist nicht nur innerhalb der PI3-Kinasen konserviert, sondern konnte auch in der Familie der PI4-Kinasen sowie in der Familie PI-Kinase-verwandter Proteine identifiziert werden (Carpenter und Cantley, 1996, Gehrmann und Heilmeyer, 1998). Ein gemeinsames Merkmal aller PI-Kinasen ist außerdem die helikale Domäne (Homologieregion II, HR2), welche ursprünglich als PIK-Domäne bezeichnet wurde. Eine dritte Homologieregion (HR3) ist innerhalb der PI3-Kinase-Familie zu finden. Sie wird als C2-Domäne bezeichnet. Die Homologieregion IV (HR4) stellt die Ras-Bindedomäne dar und beschränkt sich auf die PI3-Kinasen der Klassen I und II (Walker *et al.*, 1999). Aufgrund ihrer signifikanten Homologie zur Kinase-Domäne der PI3- und PI4-Kinasen wurden einige Proteine in eine Familie PI-Kinase-verwandter Proteine eingeordnet. Dazu gehören unter anderem *S. cerevisiae* Tor1p/Tor2p (target of rapamycin) sowie die Säugerproteine mTOR, DNA-PK (DNA-dependent Proteinkinase) und ATM (ataxia telangiectasia mutated). Für diese Proteine wurde bisher kein Lipidsubstrat identifiziert, wohl aber konnte eine Proteinkinaseaktivität nachgewiesen werden (Vanhaesebroeck *et al.*, 1999). Die Proteine Tor1p und Tor2p aus *S. cerevisiae* wurden ursprünglich als Targets des Immunophilin-Immunsuppressor-Komplexes FKBP12-Rapamycin gefunden (Heitman *et al.*, 1991). Tor1p ist an der Aktivierung der Initiation der Translation und damit der frühen G1-Progression in Reaktion auf die Verfügbarkeit von Nährstoffen beteiligt. Tor2p besitzt zwei unterschiedliche Funktionen, wovon die eine identisch mit der Funktion von Tor1p bei der Zellzykluskontrolle ist. Die zweite Funktion von Tor2p besteht in der Signaltransduktion der Zellzyklus-abhängigen polarisierten Verteilung des Aktinzytoskeletts (Schmidt *et al.*, 1996).

### **1.3.1 Vps34p-abhängige Signaltransduktion vesikelvermittelter intrazellulärer Transportprozesse in *S. cerevisiae***

Intrazelluläre Protein- und Lipidtransportprozesse sind essentiell für die Etablierung und den Erhalt der Identität der einzelnen Kompartimente einer eukaryotischen Zelle. So sind Vesikeltransportprozesse hin zur Vakuole bzw. auch wieder von ihr weg eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der normalen physiologischen Funktion dieser Organelle. Die pilzliche Vakuole erfüllt eine Reihe verschiedener Funktionen, die diese Organelle zum integralen Bestandteil einer Vielzahl zellulärer Prozesse machen (Bryant und Stevens, 1998, Klionsky *et al.*, 1990, Pringle *et al.*, 1997). Als hydrolytisch aktives Kompartiment mit saurem pH-Wert zeigt die Vakuole der Pilze funktionelle Analogie zum Lysosom der Säugerzellen (Klionsky *et al.*, 1990). Eine der Hauptfunktionen der Vakuole ist ihre Rolle als Schlüsselkompartiment des (Massen-)Turnovers von Proteinen und anderen Makromolekülen (van den Hazel *et al.*, 1996). Weiterhin spielt die Vakuole eine bedeutende Rolle als Speicher von Ionen und Metaboliten, womit der Erhalt der Ionenhomöostase, die Osmoregulation sowie die Detoxifikation ermöglicht werden (Banta



**Abb. 1.4: Sorting von Proteinen vom späten Golgi in die Vakuole bei *S. cerevisiae*.** CPY: Carboxypeptidase Y, ALP: Alkalische Phosphatase, MVB: Multivesicular Body. Die Proteine Vac1p, Vps27p und Fab1p sind Effektoren des von Vps34p gebildeten PI(3)P.

*et al.*, 1988). Ionen und kleine Moleküle können bei Bedarf zur pH-Regulation mobilisiert werden und dienen als Phosphatquelle, als Energiespeicher sowie als Stickstoffquelle, wenn die Zellen unter Stickstoffmangel geraten. Es wird außerdem angenommen, daß die Azidifizierung der Vakuole eine Voraussetzung für die Regulation des cytoplasmatischen pH-Wertes ist (Banta *et al.*, 1988).

In der Hefe *S. cerevisiae* sind vesikuläre Protein/Lipidtransportprozesse unter Beteiligung von Vps-Proteinen hin zur Vakuole gut charakterisiert. So wurden bisher mehr als 40 VPS-Gene in genetischen Screens identifiziert (Bankaitis *et al.*, 1986, Rothmann und Stevens, 1986, Robinson *et al.*, 1988). Nach gegenwärtigen Vorstellungen gibt es zwei prinzipielle biosynthetische Transportwege von vakuolären Proteinen vom Golgi-Apparat zur Vakuole (Abb. 1.4). Das ist zum einen der Carboxypeptidase Y (CPY)-Weg, in welchem die Proteine vom Golgi-Apparat über mindestens ein prävakuoläres Kompartiment in die Vakuole transportiert werden. Ein alternativer Transportweg, der Alkalische Phosphatase (ALP)-Weg, verläuft unabhängig vom CPY-Weg und ohne ein prävakuoläres Endosom als Zwischenstation (Cowles *et al.*, 1997). Vesikeltransportprozesse spielen auch bei der Endocytose eine wichtige Rolle. Interessanterweise kommunizieren Endocytosevorgänge innerhalb des endosomalen Systems mit dem Proteintransport vom Golgi zur Vakuole. So stellt das prävakuoläre Kompartiment des CPY-Weges gleichzeitig ein spätes Endosom und damit den Kreuzungspunkt biosynthetischer und endocytischer Transportwege in die Vakuole dar (Piper *et al.*, 1995).

*S. cerevisiae* Vps34p wurde ursprünglich als Teil eines molekularen Komplexes identifiziert, der für die Kontrolle des intrazellulären Proteintransports zur Vakuole verantwortlich ist (Herman und Emr, 1990, Schu *et al.*, 1993) (Abb. 1.4). In Assoziation mit

der Serin/Threonin-Proteinkinase Vps15p, welche Vps34p aktiviert und an die Golgi-Membran rekrutiert, wurde Vps34p als direkt in das Sorting der löslichen vakuolären Hydrolase CPY involviertes Protein nachgewiesen (Stack *et al.*, 1993, Stack *et al.*, 1995). CPY durchläuft den sekretorischen Pathway bis zum Golgi, wo das unreife Protein in einem Rezeptorvermittelten Prozeß in den biosynthetischen Transportweg zur Vakuole sortiert wird. Das Targetsignal für die Vakuolenlokalisierung ist dabei nicht wie in Humanzellen Mannose 6-phosphat, sondern die Sequenz QRPL, welche von einem speziellen in der Golgi-Membran lokalisierten Rezeptor, Vps10p, erkannt wird (Cereghino *et al.*, 1995). Auf welche Weise das Zusammenwirken des Rezeptors Vps10p mit dem Vps15p/Vps34p-Komplex genau funktioniert, ist bisher nicht aufgeklärt. Durch die Lipidkinase-Aktivität von Vps34p kommt es zur Bildung von PI(3)P an spezifischen Membranabschnitten (DeCamilli *et al.*, 1996). Es wird vermutet, daß PI(3)P als Signalmediator weitere Effektorproteine an die Membran rekrutiert und/oder aktiviert, wodurch schließlich die Abschnürung von proteinbeladenen Vesikeln ermöglicht wird. Solche Effektorproteine, welche den vesikulären Transport entlang des CPY-Weges vermitteln, sind beispielsweise Vac1p und Vps27p (Abb. 1.4). Diese Proteine binden an PI(3)P über ihre FYVE-Domäne (Burd und Emr, 1998). Die Funktion der FYVE-Domäne besteht nach gegenwärtigen Erkenntnissen vor allem in der selektiven Rekrutierung von interagierenden Proteinen zu spezifischen Membrankomponenten und in der Modulation ihrer Aktivität. So wurde z.B. gezeigt, daß Vac1p während des Andockens und der Fusion von Vesikeln an die GTPase Rab1p und verschiedene andere Proteine bindet (Peterson *et al.*, 1999). PI(3)P wird dabei eine regulatorische Rolle, möglicherweise bei Vac1p Protein-Protein-Interaktionen, zugesprochen. Vps27p spielt bei Endosomen-Reifungsprozessen im Zusammenhang mit der Bildung von multivesikulären Körpern (MVB's) sowie dem Rezeptor-Recycling eine Rolle (Piper *et al.*, 1995, Wurmser *et al.*, 1999). Durch die Aktivität von Vps34p werden sowohl der Transport vakuolärer Hydrolasen vom späten Golgi zu einem prävakuolären Endosom sowie vom Endosom in die Vakuole reguliert (Herman *et al.*, 1991, Schu *et al.*, 1993, Munn und Riezman, 1994, Gammie *et al.*, 1995, Stack *et al.*, 1995, Piper *et al.*, 1995, Odorizzi *et al.*, 1998). Darüberhinaus spielt Vps34p eine Rolle beim Transport von Material entlang des endocytischen Pathways (Munn und Riezman, 1994, Gammie *et al.*, 1995, Burd und Emr, 1998). Der Turnover von PI(3)P schließlich erfolgt auf zwei verschiedenen Wegen: einerseits durch die Aktivität einer PI(3)P 5-Kinase (Fab1p) und andererseits nach seinem Weitertransport in die Vakuole durch dort lokalisierte vakuoläre Hydrolasen (Dove *et al.*, 1997, Wurmser und Emr, 1998). Fab1p ist ein weiteres FYVE-Domänen enthaltendes Effektorprotein mit Bedeutung im intrazellulären Vesikeltransport. Es wandelt das von Vps34p gebildete PI(3)P in den "second messenger" PI(3,5)P<sub>2</sub> um. Auf diese Weise reguliert es den vakuolären Membranturnover und spielt somit eine wichtige Rolle bei der Vakuolenhomöostase (Gary *et al.*, 1998). Daneben ist Fab1p am Sorting bestimmter Proteine, z.B. des integralen Membranproteins Carboxypeptidase S, in MVB's beteiligt (Odorizzi *et al.*, 1998). Für den Transport vakuolärer Hydrolasen auf dem Vps34p-abhängigen CPY-Weg wird die PI(3,5P<sub>2</sub>)-Kinase Fab1p dagegen nicht benötigt (Gary *et al.*, 1998).

### 1.3.2 Vesikeltransport und Phosphoinositid-abhängige Signaltransduktion in *C. albicans*

Im Gegensatz zum intensiv untersuchten Modellorganismus *S. cerevisiae* ist in der humanpathogenen Hefe *C. albicans* bisher sehr wenig über intrazelluläre Vesikeltransportprozesse bekannt. Im Hinblick auf vielfältige Wechselwirkungen zwischen *C. albicans* und dem Wirtsorganismus ist es jedoch denkbar, daß auch das Verständnis intrazellulärer Vesikeltransportprozesse in *C. albicans* helfen könnte, die Virulenzmechanismen dieser Hefe weiter aufzuklären. Trotz der nahen Verwandtschaft zu *S. cerevisiae* existieren vor allem im Zusammenhang mit der Pathogenität wesentliche Unterschiede, welche die intensive Untersuchung zellulärer Prozesse direkt in *C. albicans* erfordern. So wird *S. cerevisiae* als apathogen angesehen und besitzt nicht die Fähigkeit zur Bildung echter Hyphen sowie zur Adhäsion an Wirtsgewebe.

In *C. albicans* wurde bisher für die Gene *SEC4* und *SEC14* gezeigt, daß sie bei Vesikeltransportprozessen eine Rolle spielen (Monteoliva *et al.*, 1996, Mao *et al.*, 1999). Bei beiden Genen war die Konstruktion von Nullmutanten nicht möglich, weshalb vermutet wird, daß diese Gene essentiell sind. Die Überexpression eines dominant-negativen Allels von *SEC4* in *C. albicans* führte zur Akkumulation sekretorischer Vesikel und zum Wachstumsstillstand. In *S. cerevisiae* kodiert *SEC4* eine kleine Ras-ähnliche GTPase, welche für die Fusion von post-Golgi-sekretorischen Vesikeln mit der Plasmamembran benötigt wird (Salminen und Novick, 1987). Sec14p ist ein Phosphatidylinositoltransferprotein (PITP), welches in *S. cerevisiae* für die Bildung sekretorischer Vesikel am Golgi-Apparat benötigt wird (Kearns *et al.*, 1997). Die Funktion dieses Proteins ist für den Erhalt des PI(4)P-Gehaltes der Golgi-Membran essentiell, wobei PI(4)P direkt an der Sekretion von Vesikeln vom Golgi zur Plasmamembran beteiligt ist. Der biosynthetische Transport von Proteinen im CPY-Weg wird dagegen nicht von Sec14p beeinflusst (Hama *et al.*, 1999). PITP's aus Säugerzellen sind ebenfalls an der Bildung sekretorischer Vesikel am Golgi beteiligt. Darüberhinaus konnte gezeigt werden, daß diese mit PI4-Kinasen und PI3-Kinasen interagieren und deren Aktivität stimulieren (Kaufmann-Zeh *et al.*, 1995, Jones *et al.*, 1998). Hinweise aus der dimorphen Hefe *Yarrowia lipolytica* belegen, daß der Sec14p-abhängige Phosphoinositidmetabolismus eine Bedeutung für den Dimorphismus dieser Hefe besitzt (Lopez *et al.*, 1994). In *Y. lipolytica* ist das Golgi-assoziierte Protein Sec14p jedoch nicht essentiell und wird nicht für den Transport im sekretorischen Pathway benötigt. Dies zeigt, daß die Funktionen von PITP's in verschiedenen Organismen in unterschiedlicher Weise genutzt werden können. Die in *Y. lipolytica* nachgewiesene Rolle von Sec14p für das dimorphe Wachstum führte zu der Frage, ob in *C. albicans* Phosphoinositid-abhängige Prozesse ebenfalls eine Rolle bei der Hyphenmorphogenese spielen. Einen Anhaltspunkt dafür, daß Phosphoinositid-abhängige Signaltransduktionsprozesse in *C. albicans* den Dimorphismus beeinflussen, liefert die Beobachtung von Gadd und Foster (1997), daß Inositol(1,4,5)trisphosphat (IP<sub>3</sub>) als "second messenger" bei der Signaltransduktion der Hefe-Hyphe-Transition fungiert. Außerdem ist bekannt, daß IP<sub>3</sub> in *C. albicans* die







Protein gegenüber *S. cerevisiae* CaVps34p eine Identität von 47% und eine Ähnlichkeit von 53%. Im C-terminalen Teil wurde zwischen beiden Proteinen dagegen eine Homologie von 65% festgestellt. Die Homologie des vollständigen Proteins zu Vps34p-Homologen aus den höheren Organismen *G. max*, *D. melanogaster* und Humanzellen fällt mit 38%, 30% bzw. 37% Identität geringer aus (Hong und Verma, 1994, Linassier *et al.*, 1997, Volinia *et al.*, 1995). Aufgrund von drei intragenischen Spacern (AS 445-468, AS 687-703, AS 775-829, Abb. 1.5) und einer kurzen zusätzlichen Sequenz am N-Terminus ist CaVps34p länger als die übrigen Vps34p-Homologen. Die relativ langen zusätzlichen Sequenzen in Bereichen hoher Homologie könnten auf funktionelle Unterschiede zwischen CaVps34p und den anderen Vps34-Proteinen hinweisen. Homologieregionen, welche in allen Klasse III PI3-Kinasen gefunden werden (Zvelebil *et al.*, 1996), können auch in CaVps34p identifiziert werden (Abb. 1.5). Die stärkste Homologie zwischen allen Vps34 Proteinen wurde in der katalytischen Domäne (Homologie-Region 1, HR1) gefunden. Diese umfaßt die Aminosäuren 579-1020 von CaVps34p. Ebenfalls sehr stark homolog ist der C-terminale Teil der helikalen Domäne (HR2) zwischen den Aminosäuren 424 und 578 (Walker *et al.*, 1999). Die N-terminale C2-Domäne (HR3) von CaVps34p zeigte geringe Homologie zu den anderen Vps34p-Proteinen. Die C-terminale Region von CaVps34p enthält konservierte Sequenzen (AA 492-504, 711-748, 858-896 und 928-963), die alle bekannten PI3- und PI4-Kinasen aufweisen. Darin kann wiederum eine Kinase-Domäne abgegrenzt werden, welche in sämtlichen PI3-Kinase-verwandten Proteinen konserviert ist und Motive von Proteinkinasen enthält (Zvelebil *et al.*, 1996). Dazu gehören der katalytische Loop (DXHXXN) und das DFG-Motiv (Abb. 1.5).

## 1.4 Zielstellung der Arbeit

Hauptgegenstand der vorliegenden Arbeit ist die umfassende Charakterisierung der putativen PI3-Kinase Vps34p aus der humanpathogenen Hefe *C. albicans*. Dabei sollten molekulare, biochemische und funktionelle Aspekte analysiert werden. Einen Schwerpunkt bildete die Untersuchung der physiologischen Rolle von CaVps34p insbesondere im Hinblick auf das pathogene Potential von *C. albicans*. Zu diesem Zweck wurde der Einfluß von CaVps34p auf ausgewählte Virulenzeigenschaften wie Dimorphismus und Adhäsion von *C. albicans* untersucht. *CaVPS34* sollte in dem *C. albicans*-Stamm CAI4 sequentiell disruptiert und die erhaltenen Disruptanten eingehend phänotypisch charakterisiert werden. In den Untersuchungen sollte ebenfalls geklärt werden, ob CaVps34p bei Vesikeltransportprozessen in *C. albicans* eine Rolle spielt. Neben den Arbeiten mit *CaVPS34* sollte versucht werden, mit Hilfe eines PCR-Homologieansatzes mögliche weitere PI3-Kinase-verwandte Proteine in *C. albicans* zu identifizieren. Eine weitere interessante Frage war die Untersuchung einer möglichen funktionellen Verbindung zwischen der Aktivität von Vps34p und Torp-abhängigen Prozessen. Erste Anhaltspunkte dazu sollten anhand von Überexpressionsanalysen der *C. albicans* PI3-Kinase Vps34p in verschiedenen *tor*-Mutanten von *S. cerevisiae* gewonnen werden.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Stammhaltung und Kultivierung

#### 2.1.1 *Escherichia coli*-Stämme

Stamm	Genotyp
<i>E. coli</i> XL1-Blue	<i>supE44 hsdR17 rec A1 end A1 gyrA46 thi relA1 lac</i> <i>F'</i> [ <i>proAB+</i> <i>lacIq</i> <i>M15</i> <i>Tn10(tetr)</i> ] (Stratagene, La Jolla, USA)
<i>E. coli</i> M15[pREP4]	<i>Nal<sup>s</sup>, Str<sup>s</sup>, Rif<sup>s</sup>, Thi<sup>-</sup>, Lac<sup>-</sup>, Ara<sup>+</sup>, Gal<sup>+</sup>, Mtl<sup>-</sup>, F<sup>-</sup>, RecA<sup>+</sup>, Uvr<sup>+</sup>, Lon<sup>+</sup></i> (Qiagen, Hilden)

#### 2.1.2 *Saccharomyces cerevisiae*-Stämme

Stamm	Genotyp
CEN.PK2	<i>Mat a/Mat α leu2-3/ leu2-3, ura3-52/ura3-52 his3-Δ1/his3-Δ1 trp1-289/trp1-289</i> (Entian et al., 1999)
PHY102	<i>Mat α leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 vps34Δ1::TRP1</i> (Herman und Emr, 1990)
PHY112	<i>Mat α leu2-3,112 ura3-52 his3-Δ200 trp1-Δ901 lys2-801 suc2-Δ9 vps15Δ1::HIS3</i> (Herman et al., 1991)
SH100	<i>Mat a, leu 2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLa ade2Δtor2:: ADE2-3/YCplac111::TOR2</i> (Helliwell et al., 1998)
SH121	<i>Mat a, leu 2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his4 GAL+ HMLa ade2Δtor2:: ADE2-3/YCplac111::tor2-21ts</i> (Helliwell et al., 1998)
SH200	<i>Mat a, leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his3 GAL+ HMLa ade2Δtor1:: HIS3-3 tor2::ADE2-3/YCplac111::TOR2</i> (Helliwell et al., 1998)
SH221	<i>Mat a leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his3 GAL+ HMLa ade2Δtor1:: HIS3-3 tor2::ADE2-3/YCplac111::TOR2</i> (Helliwell et al., 1998)
SH229	<i>Mat a leu2-3,112 ura3-52 rme1 trp1 his3 GAL+ HMLa ade2Δtor1:: HIS3-3 tor2::ADE2-3/ YCplac111::tor2-29ts</i> (Helliwell et al., 1998)

#### 2.1.3 *Candida albicans*-Stämme

Stellvertretend für *CaVPS34*-Mutanten bzw. -Revertanten mit dem gleichen Genotyp ist in untenstehender Tabelle jeweils nur ein Stamm aufgeführt. Dabei handelt es sich um die Stämme, mit denen bis hin zur phänotypischen Charakterisierung weitergearbeitet wurde.

Stamm	Genotyp	Referenz
3153A	Wildtypstamm	ATCC28367
SC5314	Wildtypstamm	(Fonzi und
CAI4	$\Delta\text{ura3::imm434}/\Delta\text{ura3::imm434}$ , sonst isogenisch zu SC5314	Irwin, 1993)
CAV1	$\Delta\text{vps34::hisG-URA3-hisG/VPS34}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/$ $\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit
CAV2	$\Delta\text{vps34::hisG/VPS34}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit
CAV3	$\Delta\text{vps34::hisG}/\Delta\text{vps34::hisG-URA3-hisG}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/$ $\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit
CAV4	$\Delta\text{vps34::hisG}/\Delta\text{vps34::hisG}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit
CAV5	$\Delta\text{vps34::hisG/VPS34-URA3}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/$ $\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit
CAV6	$\text{VPS34-URA3/VPS34}$ , $\Delta\text{ura3::imm434}/\Delta\text{ura3::imm434}$	diese Arbeit

### 2.1.4 Weitere Pilzstämme

*Candida tropicalis* (IMET<sup>1</sup> 25007), *Candida krusei* (IMET 25002), *Candida parapsilosis* (IMET 25015), *Candida glabrata* (IMET 25080), *Kluyveromyces lactis* (IMET 25216), *Aspergillus fumigatus* (HKI<sup>2</sup> 0116), *Schizosaccharomyces pombe* (IMET 25066), *Saccharomyces cerevisiae* (IMET 25036), *Giberella fujikoroj* (Stammsammlung des Instituts für Mikrobiologie, FSU Jena)

### 2.1.5 Nährmedien

Medien zur Anzucht von *E. coli* :

LB: 1% Bactotrypton	2×YT: 1,6% Bactotrypton	SOC: 2% Bactotrypton
0,5% Hefeextrakt	1% Hefeextrakt	0,5% Hefeextrakt
0,5% NaCl	0,5% NaCl	0,05% NaCl
pH 7,4		0,4% Glukose
		10 mM MgCl <sub>2</sub>
		10 mM MgSO <sub>4</sub>

Für die Anzucht unter Selektivbedingungen erfolgte die Zugabe der Antibiotika wie folgt: Ampicillin (100 µg/ml), Kanamycin (25 µg/ml), Tetracyclin (12,5 µg/ml). Feste Nährböden wurden mit 2% (w/v) Agar hergestellt. Eine Blau-Weiß-Selektion rekombinanter Klone erfolgte bei Klonierung in pCRScript™ Amp SK(+) (Stratagene) mit IPTG und X-Gal.

<sup>1</sup>IMET: Stammsammlung des ehem. Instituts für Mikrobiologie und Experimentelle Therapie, Jena

<sup>2</sup>HKI: Stammsammlung des Hans-Knöll-Instituts für Naturstoff-Forschung e. V., Jena

Medien zur Anzucht von *S. cerevisiae* und *C. albicans* :

YPD: 2% Glucose	Sabouraud: 1% Pepton	YNB: 0,7% Hefe-Stickstoff-Basis
2% Bactopepton	(aus Casein)	(ohne Aminosäuren)
1% Hefeextrakt	2% Glukose	2% Glukose
pH 5,5-6,0		

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchten *S. cerevisiae*- und *C. albicans*-Stämme wurden routinemäßig bei 28°C in YPD-Vollmedium kultiviert. Auxotrophe Stämme benötigten zum Wachstum auf Selektivmedien die Zugabe der entsprechenden Aminosäuren bzw. Nukleoside: jeweils 50 µl/ml Adenin, Histidin, Lysin, Tryptophan, Leucin, Uridin. Eine positive Selektion von uridinauxotrophen Revertanten erfolgte auf Platten mit 1,5 mg/ml 5-FOA (ICN, Eschwege) und 50 µg/ml Uridin (Boeke *et al.*, 1984).

### 2.1.6 Bestimmung der Wachstumsraten verschiedener *C. albicans*-Stämme

Die vergleichende Bestimmung der spezifischen Wachstumsraten der *C. albicans*-Stämme erfolgte in YPD- bzw. YNB-Medium bei 28°C. Die Stämme wurden zunächst in einer Vorkultur bis in die stationäre Wachstumsphase gebracht, um daraus die Hauptkultur mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml anzupfen. Durch Zellzahlbestimmung in der Thomakammer wurde das Wachstum der Kulturen über einen Zeitraum von 24 h bzw. 54 h verfolgt.

### 2.1.7 Untersuchung des hyphalen Wachstums von *C. albicans*

In Flüssigkulturen wurde hyphales Wachstum von *C. albicans* induziert, indem Kulturen aus der späten logarithmischen Wachstumsphase 1:10 verdünnt in frisches Induktionsmedium überführt und bei 37°C inkubiert wurden. Dabei wurde entweder mit 10% Fötalem Kälberserum (Fetal Calf Serum, FCS, Sigma, Deisenhofen) in YPD- oder Sabouraud-Medium induziert oder es wurde "Spider"-Medium (Liu *et al.*, 1994) mit Mannitol als C-Quelle verwendet. Zur Hypheninduktion auf festen Nährmedien wurde YPD-Agar mit 10% FCS verwendet oder aber Spider-Platten eingesetzt. Die Inkubationszeit der Platten bei 37°C betrug 5–7 Tage. Die Koloniemorphologie wurde an einem Stereomikroskop SZ4045TR (Olympus Optical CO., Hamburg) untersucht.

Spider-Medium: 1% Nutrient Broth  
0,2% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1% Mannitol  
für Platten Zugabe von 1,35% Agar

### 2.1.8 Untersuchungen zur Temperatur- und Osmosensitivität von *C. albicans*-Stämmen

Die vergleichende Untersuchung der Temperatursensitivität der *C. albicans*-Stämme erfolgte auf YPD-Agar bei 30°C, 37°C, 40°C und 42°C. Für die Untersuchung der Osmosensitivität wurden die Salze NaCl bzw. KCl in den Konzentrationen 1 M und 1,5 M

vor dem Gießen der Platten in heißem YPD-Agar gelöst. Die Inkubation der *C. albicans*-Stämme unter hyperosmotischem Streß erfolgte bei 28°C und 37°C.

## 2.2 Nukleinsäurearbeiten

### 2.2.1 Primer und Sonden

Nachfolgend sind die für Klonierungsexperimente verwendeten PCR-Primer aufgeführt, wobei die unterstrichene Sequenz jeweils komplementär zur genomischen Sequenz von *CaVPS34* ist. Die Darstellung der Primer erfolgt von 5' nach 3'. Alle hier aufgeführten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG-Biotech (Ebersberg) synthetisiert.

Primer für die Klonierung von *CaVPS34* in den Überexpressionsvektor pQE9:

PQ1: CGGGATCCGCGACACTCTCACAACCACAAAGC

(Position +4 bis +27, liefert *Bam*HI-Ort)

PQ2: GCCTGCAGTTAAGCTCTCCAATACTGTGCTAA

(Position +3040 bis +3063, liefert *Pst*I-Ort)

Primer zur Konstruktion des Disruptionsplasmids pVA1:

5'-Region(274 bp):

PV1: GCGAGCTCCAAGTATATTATGCACTGTTAC

(Position -108 bis -85, liefert *Sac*I-Ort )

PV2: GCGGTACCGTTGATAATGGGACTAAAGAGAC

(Position +130 bis +152, liefert *Kpn*I-Ort)

3'-Region (241 bp):

PV3: GCGTCGACAGTTTAGCACAGTATTGGAGAGCT

(Position +3037 bis +3060, liefert *Sal*I-Ort)

PV4: GCCTGCAGATGTGCTCAAAAGGGAAACAATGT

(Position +3238 bis +3261, liefert *Pst*I-Ort)

Standardprimer zur Ansequenzierung von rekombinanten Klonen:

T7            GTAATACGACTCACTATAGGGC

M13 (-20)    GTAAAACGACGGCCAGT

M13 reverse   GGAAACAGCTATGACCATG

pQE III/IV    GAATTCATTAAAGAGGAGAAA

ROREV        AACAGCTATGACCATGATTA

ROFOW        TTGTAAAACGACGGCCAGTG

Primer zur Kontrollsequenzierung von *CaVPS34*:

PK1	TGAAGGTTTGATCATAATCTTAG	PK11	GCCACTCCACAATTGAGAGATG
PK8	CATCAAAAAATGACATTGCCTAG	PK13	GGTTCTTCCTAAAGTTGATGCC
PK9	TTATCCTGAGGAATCATCAGTTT	PK14	GGAAGACGACCCCCAATATAG
PK10	CGGGTATTTCCATATCTAGATCG	PK16	GTTTTAGCACAGTATTGGAG

Primer zur Amplifizierung einer *CaTOR*-spezifischen Gen-Sonde:

AB9	GGTCATGAAGATATTAGACAAGAT
PIK2P	GCCTGCAGGGTGATGATTTGAGACAAGAT

Die zur Hybridisierung eingesetzten Gen-Sonden sind im Anschluß dokumentiert.

Gen-Sonde	Beschreibung
<i>CaVPS34</i>	2,9 kb <i>BsmI</i> -Fragment aus pKE2 (Position +111 bis +3006)
<i>CaVPS34</i>	4,9 kb <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment aus pKE2
<i>CaVPS34</i>	1,1 kb <i>SalI</i> / <i>SphI</i> -Fragment aus pKE2 (Position +1574 bis +2672)
<i>CaACT1</i>	1,5 kb <i>Clal</i> / <i>SalI</i> -Fragment aus p1595/3 (Losberger und Ernst, 1989)

2.2.2 Plasmide

Nachfolgend sind die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangsplasmide aufgeführt.

Plasmid	Beschreibung
pUC18:	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor (Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985)
pCR-Script™	
Amp SK(+):	<i>E. coli</i> -Klonierungsvektor (Stratagene)
pYES2:	<i>URA3</i> -markierter 2μ-Vektor mit induzierbarem <i>GAL1</i> -Promoter zur Proteinexpression in <i>S. cerevisiae</i> (Invitrogen)
pYES2G:	pYES2 mit GST-Tag zur Proteinaufreinigung (C. Bergmann)
YCp50p:	<i>E. coli</i> / <i>S. cerevisiae</i> Shuttle-Vektor (Rose <i>et al.</i> , 1987)
pQE9:	<i>E. coli</i> -Proteinexpressionsvektor (Qiagen)
pMB7:	<i>C. albicans</i> -Disruptionsvektor (Fonzi und Irwin, 1993)
p1595/3:	pBR322 mit 1,5 kb <i>SalI</i> / <i>Clal</i> -Fragment mit <i>CaACT1</i> (Losberger und Ernst, 1989)
pKE1:	pUC18 mit 7,0 kb <i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i> (Eck <i>et al.</i> , im Druck)

Die folgenden Plasmide wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit konstruiert.

Plasmid	Beschreibung
pKE2	pUC18 mit 4,9 kb <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
pVA0	pMB7 mit N-terminalem <i>CaVPS34</i> -Disruptionskonstrukt
pVA1	pVA0 mit C-terminalem <i>CaVPS34</i> -Disruptionskonstrukt
pKEU1	wie pKE2, aber mit <i>CaURA3</i>
pBAB1	pRCScript™ mit 3,1 kb <i>BamHI</i> / <i>PstI</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
pBAB2	pRCScript™ mit 4,9 kb <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
YCpAB2	YCp50 mit 4,9 kb <i>EcoRI</i> / <i>HindIII</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
pYGAB1	pYES2G mit 3,1 kb <i>BamHI</i> / <i>EcoRI</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
pVPEX1	pQE9 mit 3,1 kb <i>BamHI</i> / <i>PstI</i> -Fragment mit <i>CaVPS34</i>
pCaTOR	pCR-Script™ mit 363 bp <i>CaTOR</i> -PCR-Produkt

### 2.2.3 Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR, Mullis und Fallona, 1987) können unter Verwendung von thermostabilen DNA-Polymerasen und spezifischen Oligonukleotidprimern DNA-Fragmente gezielt amplifiziert werden. PCR-Ansätze folgender Zusammensetzung wurden dazu auf Eis in 0,5 bzw. 0,25 ml PCR-Reagenzgefäße pipettiert:

- 83  $\mu$ l DNA (50 ng) in aqua dest.
- 10  $\mu$ l 10 $\times$  PCR-Puffer (enthielt 20 mM  $MgSO_4$ )
- 2  $\mu$ l dNTP-Mix (je 40 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)
- 2  $\mu$ l Primer A (100 pmol/ $\mu$ l)
- 2  $\mu$ l Primer B (100 pmol/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l Pwo-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)

Reaktionsbedingungen:

- 1 $\times$  5 min 95°C (Denaturierung)
- 29 $\times$  30 s 94°C (Denaturierung)
- 1 min 52°C (Annealing)
- 2 min 72°C (Synthese)
- 1 $\times$  5 min 72°C (Auffüllen)

Die PCR-Reaktionen wurden unter den oben beispielhaft angegebenen Reaktionsbedingungen in einem Hybaid Omn-E Thermocycler oder einem Primus 96 Thermocycler (beide Geräte von MWG Biotech) durchgeführt. Aufgrund der vorhandenen Deckelheizung entfiel eine Übersichtung der Proben mit Mineralöl. Neben Pwo-Polymerase wurde auch Taq-Polymerase (beide Roche Molecular Biochemicals, Mannheim) sowie Pfu-Polymerase (New England Biolabs, Schwalbach) verwendet. Desoxynukleotide wurden von Roche Molecular Biochemicals, New England Biolabs bzw. Amersham Pharmacia Biotech (Freiburg) bezogen.

### 2.2.4 DNA-Sequenzierung

Grundlage der verwendeten Methode bildet die enzymatische Didesoxysequenzierung nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Das Prinzip des Cycle-Sequencing (Murray, 1989) beinhaltet die Kombination der Methode nach Sanger mit der Polymerasekettenreaktion. Die Verwendung einer hitzestabilen DNA-Polymerase ermöglicht es, einen DNA-Strang mehrmals als Template zu nutzen und so die Sensitivität der Sequenzanalyse zu steigern. Um einer Kompression der Banden vorzubeugen, enthalten die Nukleotidgemische 7-deaza-dGTP. Es wurde der "Thermo Sequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit with 7-deaza-dGTP" (Amersham Pharmacia Biotech) eingesetzt, wobei die Reaktionsansätze, wie nachfolgend angegeben, auf Eis pipettiert und anschließend in einem Thermocycler Primus 96 (MWG-Biotech) inkubiert wurden.

Reaktionsansatz: 2  $\mu$ l Nukleotid + Sequenase-Mix (A, C, G oder T)  
4  $\mu$ l Primer-Template-DNA-Mix

**Primer-Template-DNA-Mix:**

2  $\mu$ l Primer (1 pmol/ $\mu$ l)  
2-15  $\mu$ l Plasmid-DNA (2  $\mu$ g)  
0-13  $\mu$ l aqua dest.

**Reaktionsbedingungen:**

1  $\times$  5 min 95°C (Denaturierung)  
30  $\times$  30 s 95°C (Denaturierung)  
30 s 52°C (Annealing)  
60 s 70°C (Synthese)

Nach dem Abstoppen der Reaktion mit 3  $\mu$ l Stopperlösung (enthält 50% Formamid) wurden je 1,5  $\mu$ l der Proben auf das Sequenziergel aufgetragen. Die Auftrennung der Banden erfolgte in einem 4%igen PAA-Gel (66 cm Länge, 0,25 cm Dicke), wobei eine spezielle PAA-Stammlösung verwendet wurde (Long Ranger Gelkonzentrat, Biozym Diagnostik GmbH, Hess. Oldendorf), mit 1  $\times$  TBE als Laufpuffer.

4% PAA-Gel: 25,2 g Harnstoff

4,8 ml 50% Long Ranger Gelkonzentrat

7,2 ml 10  $\times$  TBE

aufgefüllt auf 60 ml mit aqua dest.

10  $\times$  TBE: 890 mM Tris

890 mM Borsäure

20 mM EDTA

pH 8,0

Unmittelbar vor dem Gießen des Gels erfolgte die Zugabe von 250  $\mu$ l 10% APS und 25  $\mu$ l TEMED. Für die automatische Sequenzierung mit dem Sequenzierapparat Licor 4000 (MWG) wurden folgende Standardparameter eingestellt: U=2000 V, I=25 mA, P=45 W, T=45°C, Scan speed: 2, Signal channel: 1, Frames: 25. Es erfolgte ein Vorlauf vor dem Laden des Gels bis zum Erreichen der eingestellten Temperatur. Die Detektion der verschiedenen Fragmente wurde durch den Einsatz von mit einem Infrarot-Fluoreszenzfarbstoff (IRD 800) 5'-endmarkierten Primern ermöglicht. Zur Auswertung des erhaltenen Bandenmusters stand eine entsprechende Licor-Software zur Verfügung.

### 2.2.5 Restriktionsreaktionen

Für die Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsendonukleasen wurden in einem Standardansatz pro  $\mu$ g DNA 3-4 U Enzym in dem entsprechenden Reaktionspuffer eingesetzt, um eine vollständige Spaltung zu gewährleisten. Dabei wurden die Ansätze 1,5 h bei 37°C bzw. der angegebenen optimalen Reaktionstemperatur der Restriktase inkubiert. Die Spaltung von PCR-Produkten in der Nähe ihrer Enden verläuft in Abhängigkeit von Restriktionsort und angrenzenden Sequenzen mit unterschiedlicher Effizienz. Aus diesem Grunde wurde bei der Wahl der über PCR eingeführten Spaltstellen darauf geachtet, günstige Bedingungen zu wählen, indem z.B. neben der eigentlichen Erkennungssequenz der Restriktase zusätzliche Nukleotide am 5'-Ende des PCR-Primers eingefügt wurden. Außerdem wurden Ansätze mit PCR-Produkten länger (3h) inkubiert.

### 2.2.6 DNA-modifizierende Enzymreaktionen

Um bei vorhandenen überhängenden Enden glatte Enden für die Ligation zu erhalten, gibt es z.B. die Möglichkeit, 3'-Überhänge mit Hilfe des Klenow-Fragmentes der DNA-Polymerase I aufzufüllen. Eine andere Möglichkeit besteht darin, unter Verwendung der



T4 DNA Polymerase 3'-Überhänge zu entfernen bzw. 5'-Überhänge aufzufüllen. Die im konkreten Fall verwendeten Restriktionsenzyme lieferten 3'-Überhänge, und die DNA sollte nicht verkürzt werden, so daß hier die erstgenannte Möglichkeit gewählt wurde. Das Auffüllen von 3'-Überhängen mit Hilfe des Klenow-Fragmentes erfolgte, wenn möglich, direkt nach Hitzeinaktivierung des Restriktionsenzym im selben Reaktionspuffer. Dem Ansatz wurden dann lediglich alle vier dNTP's (je 33  $\mu$ M), 1U Klenow-Enzym (Roche Molecular Biochemicals) und dem neuen Endvolumen entsprechend noch Puffer und aqua dest. zugegeben. Die Auffüllreaktion erfolgte für 25 min bei 37°C. Sie wurde durch Zugabe von 10 mM EDTA und 10 min Erhitzen auf 75°C abgestoppt. Auftrennung und Reinigung der Fragmente erfolgten über Agarosegelelektrophorese und anschließende DNA-Isolierung. Für eine ungerichtete Klonierung (kompatible Enden der Vektor-DNA) wurde der geschnittene Vektor zunächst dephosphoryliert, um seine Rezirkularisierung möglichst zu verhindern. Das geschah durch Hydrolyse der Phosphatgruppen am 5'-Ende des DNA-Moleküls mit Hilfe der hitzeinaktivierbaren alkalischen Phosphatase aus Garnelen (Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP), Roche Molecular Biochemicals). Der entsprechende Reaktionsansatz enthielt die geschnittene DNA (50 ng), 1× Dephosphorylierungspuffer sowie 1 U SAP und wurde 10-60 min bei 37°C inkubiert. Durch anschließendes 15minütiges Erhitzen auf 65°C erfolgte die Inaktivierung des Enzyms. Mit Hilfe der Polynukleotidkinase (PNK, Roche Molecular Biochemicals) wurde der Dephosphorylierungsschritt der SAP rückgängig gemacht, um anschließend eine entsprechende Kontroll-Ligation durchführen zu können. Die PNK katalysiert dabei den Transfer der endständigen Phosphatgruppe von ATP auf die 5'-Hydroxylgruppe der DNA. In einem Ansatz waren neben der gelösten DNA ( $\approx$  20 pMol 5'-OH-Enden), 1 mM ATP, 1× PNK-Puffer und 10 U PNK enthalten. Das Gemisch wurde 30 min bei 37°C inkubiert.

### **2.2.7 Isolierung von DNA aus Agarosegelen**

Zur gelelektrophoretischen Auftrennung von DNA-Fragmenten nach ihrem Molekulargewicht wurden 0,8-2%ige Agarosegele eingesetzt, wobei als Laufpuffer 1x TAE (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA, pH 8,0) verwendet wurde. Durch Färbung mit 0,5  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid wurden die DNA-Banden im UV-Licht sichtbar gemacht. Die zur Größenbestimmung linearisierter DNA mitgeführten Größenstandards waren ein 1kb bzw. 100 bp DNA-Standard (Biolabs, Gibco). Nach der Auftrennung erfolgte die Isolierung von DNA-Fragmenten aus dem Agarosegel wahlweise unter Anwendung verschiedener Methoden. Zunächst wurden dazu die gewünschten Banden am UV-Transilluminator aus dem Gel geschnitten. Bei einer Isolierung mittels Dialyse wurden die Gelstücke zusammen mit einem geeigneten Volumen TAE-Puffer vorsichtig in einen semipermeablen Dialyseschlauch gebracht. Mittels Elektrophorese wurde die DNA anschließend eluiert und konnte nach Phenol/Chloroform-Extraktion durch Zugabe von 1/10 Volumen 3M Na-acetat (pH 7,0) und 2,5 Volumen 96% Ethanol aus dem TAE-Puffer gefällt werden. Alternativ dazu wurden QIAquick Gelextraktionssäulchen (Quiagen) verwendet und ent-

sprechend dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, daß das Gelstück zunächst mit Puffer versetzt und bei 50°C geschmolzen wird. Durch die anschließende Zentrifugation wird die DNA an die Säulenmatrix gebunden. Es schließen sich Waschschrte an, bevor die DNA durch ein geringes Volumen aqua dest. oder TE-Puffer über Zentrifugation von der Säule eluiert wird. Beide Methoden weisen einen geringen Verlust sowie eine hohe Reinheit der DNA auf.

### **2.2.8 Ligationsreaktionen**

Für die Ligation von DNA-Fragmenten wurde entweder die T4-Ligase (Roche Molecular Biochemicals) oder aber der Fast-Link<sup>TM</sup> DNA Ligation and Screening Kit (Biozym Diagnostik GmbH) verwendet. Bei der Ligation überhängender Enden wurde ein Vektor-Insert-Verhältnis von 1:2, im Falle einer Ligation glatter Enden von 1:5 gewählt. Pro Ligationsansatz wurden 2 U Ligase eingesetzt. Die Inkubationszeit betrug bei Verwendung der Fast-Link-Ligase 15-60 min bei RT. Bei Einsatz der T4-Ligase wurden kohäsive Enden dagegen 10 h bei 16°C ligiert. Im Anschluß erfolgte durch Phenolextraktion die Abtrennung der Ligase aus dem Ansatz. Nach der Fällung wurde die DNA in 10 µl aqua dest. aufgenommen. Die Klonierung des 363 bp *CaTOR*-Fragmentes erfolgte mit Hilfe des pCR-Script<sup>TM</sup>SK(+)-Kits (Stratagene). Dies war aufgrund der durch die Pwo-Polymerase gelieferten glatten Enden des PCR-Produktes direkt möglich.

### **2.2.9 Minipräparation von Plasmid-DNA aus *E. coli***

Die Präparation kleiner DNA-Mengen aus Bakterien erfolgte nach der Methode der alkalischen Lyse nach Birnboim und Dooly (1979). 3 ml LB-Medium wurden mit einer Einzelkolonie beimpft und über Nacht bei 37°C unter Schütteln inkubiert. 1,5 ml der Bakterienkultur wurden in Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und durch Zentrifugation (1 min, 10 000 rpm) pelletiert. Das Pellet wurde in 80 µl Lösung 1 (50 mM Glukose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA) resuspendiert und mit 20 µl einer Lysozymlösung versetzt, 5 min bei RT inkubiert und nach Zugabe von 200 µl Lösung 2 (0,2 N NaOH, 1% SDS) 5 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 150 µl Lösung 3 (3 M K-acetat, pH 4,8) zugegeben und wiederum 5 min auf Eis inkubiert. Durch 15 min Zentrifugation bei 13 000 rpm wurden präzipitierte Proteine und chromosomale DNA von der Plasmid-DNA abgetrennt. Sollte die präparierte Plasmid-DNA besonders sauber sein, wurde an dieser Stelle der Überstand einer Phenol/Chloroform-Extraktion unterworfen. Für ein Screening von rekombinanten Klonen war es jedoch in den meisten Fällen ausreichend, die Plasmid-DNA mit 0,7 Volumen Isopropanol direkt aus dem Überstand zu fällen.

### **2.2.10 Isolierung von Plasmid-DNA mit Hilfe von Anionenaustausch-Säulen**

Zur quantitativen Präparation größerer Mengen Plasmid-DNA (bis 100 µg) wurden Anionenaustausch-Säulen (Nucleobond AX PC-Kit 2000, Macherey & Nagel, Düren) eingesetzt. 100 ml Bakterienkultur wurden abzentrifugiert und nach einer modifizierten Me-

thode der alkalischen Lyse aufgearbeitet. Nachdem Zellbruchstücke und chromosomale DNA in einem Zentrifugationsschritt abgetrennt worden waren, erfolgte das Überführen des Überstandes auf eine equilibrierte Anionenaustausch-Säule. Die an die Säulenmatrix gebundene Plasmid-DNA wurde gewaschen und im Anschluß daran durch Veränderung des Salzgehaltes und pH-Wertes eluiert. Die verwendeten Puffer und Lösungen waren im Kit enthalten, und es wurde entsprechend dem Protokoll des Herstellers gearbeitet. Durch Zugabe von 0,7 Volumen Isopropanol erfolgte die Fällung der DNA, die nach Zentrifugation, Waschen und Trocknen in 100  $\mu$ l aqua dest. bzw. TE-Puffer (0,5 mM Tris-HCl pH 7,8, 1 mM EDTA) aufgenommen wurde.

#### **2.2.11 Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae***

Bei der Plasmidisolierung aus *S. cerevisiae* wurde nach einer modifizierten Methode von Hoffmann und Winston (1987) gearbeitet. 2 ml einer Übernachtskultur von *S. cerevisiae* wurden abzentrifugiert und das Pellet in 200  $\mu$ l Lysispuffer (100 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl, pH 8,0, 1 mM EDTA, 1% SDS) aufgenommen. Der Suspension wurden 2% Triton zugegeben. Der Aufschluß der Zellen erfolgte durch 2 min Vortexieren mit 0,3 g sterilen Glasperlen ( $\varnothing$  0,45 mm). Nach Zugabe von 200  $\mu$ l Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1, v/v/v) und nochmaligem Vortexieren für 2 min wurden Zellbruchstücke abzentrifugiert und der Überstand mit Chloroform extrahiert. Die DNA in der Oberphase wurde gefällt und in 30  $\mu$ l aqua dest. aufgenommen. 10  $\mu$ l davon wurden zur Transformation von 100  $\mu$ l kompetenten *E. coli* XL1-Blue Zellen eingesetzt.

#### **2.2.12 Isolierung chromosomaler DNA aus *C. albicans***

Die Zellwand von *C. albicans* ist außerordentlich stabil, so daß ein Aufbrechen der Zellen allein durch 2% SDS und kräftiges Vortexieren wie beispielsweise bei *S. cerevisiae* hier nicht möglich ist. *C. albicans*-Zellen müssen zuvor entweder mit Hilfe von zellwandlysierenden Enzymen protoplastiert oder mechanisch aufgeschlossen werden. Die verwendete Methode zur Isolierung von chromosomaler DNA aus Mais (Dellaporta *et al.*, 1985) wurde für *C. albicans* deshalb entsprechend modifiziert. Die Anzucht der Kulturen zur Isolierung genomischer DNA erfolgte als Übernachtskultur in YPD-Medium. Das durch 5 min Zentrifugation bei 4800 rpm gewonnene Zellpellet wurde 2 $\times$  in 0,9 M NaCl gewaschen, anschließend in 20 ml derselben Lösung aufgenommen und zur Protoplastierung mit 30 ml einer zellwandlysierenden *Trichoderma harzianum*-Suspension versetzt. Nach einer Inkubationszeit von mindestens 2 h bei 37°C war der im Mikroskop überprüfte Grad der Protoplastierung der Kultur ausreichend für die nachfolgende Isolierung chromosomaler DNA. Durch 5 min Zentrifugation bei 2300 rpm wurden die Zellen pelletiert und in 10 ml Lysispuffer (25 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM EDTA) aufgenommen. Diese Suspension wurde mit 1 ml 5 M NaCl versetzt und kräftig vortexiert. Danach wurden 2,4 ml 10% SDS zugegeben und erneut kräftig vortexiert, um die Zellen vollständig zu lysieren. Das Lysat wurde 30 min bei 65°C inkubiert. Im Anschluß daran wurden 4,8 ml 5 M K-acetat

zugegeben, die Suspension vortexiert und 20 min auf Eis gestellt. Die präzipitierten Proteine wurden durch 30 min Zentrifugation bei 6000 rpm pelletiert und der Überstand in ein frisches Falcon-Gefäß überführt. Die im Überstand befindlichen Nucleinsäuren wurden mit 0,7 Volumen Isopropanol gefällt, abzentrifugiert, mit 70% Ethanol gewaschen und nach dem Trocknen in 3 ml Lysispuffer aufgenommen. Es folgte eine RNase A-Behandlung (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 min bei 37°C. Durch anschließendes Extrahieren des Ansatzes mit Phenol/Chloroform (1:1, v/v) und Waschen mit Chloroform/Isoamylalkohol (1:24, v/v) wurde dieser erneut von Proteinen gereinigt. Die genomische DNA aus der Oberphase wurde gefällt und nach dem Abzentrifugieren, Waschen und Trocknen in einem geeigneten Volumen TE-Puffer aufgenommen. Die Konzentrationsbestimmung der isolierten genomischen DNA erfolgte im UV-VIS Spektrometer ( $1 \text{ OD}_{260\text{nm}}=50 \mu\text{g}/\text{ml}$  doppelsträngige DNA). Die beschriebene Prozedur wurde ebenfalls angewendet, um genomische DNA aus den unter 2.1.4 aufgeführten Pilzstämmen zu isolieren.

### 2.2.13 Isolierung von RNA aus *C. albicans*

Für die Analyse der mRNA-Expression wurde *C. albicans* SC5314 in YPD-Medium bei 28°C bis in die späte exponentielle Wachstumsphase kultiviert. Anschließend wurden je 25 ml dieser Kultur in 250 ml frisches Medium inokuliert und bei 28°C bzw. 37°C schüttelinkubiert. Die Isolierung von Gesamt-RNA erfolgte zu verschiedenen Zeitpunkten aus je 25 ml Kultur. Zur RNA-Isolierung während eines Wachstumsexperimentes wurden 800 ml YPD mit 16 ml einer Übernachtskultur inokuliert, um eine Ausgangszellzahl von  $1,2 \times 10^7/\text{ml}$  zu erreichen. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit einem Häemocytometer zum jeweiligen Zeitpunkt der Probennahme für die RNA-Isolierung. Nach dem Pelletieren der Zellen (5 min, 4800 rpm) wurden diese in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Aufarbeitung aller Proben bei -20°C gelagert.

Gesamt-RNA aus *C. albicans* wurde unter Verwendung des RNeasy Midi Isolierungskits (Quiagen) nach dem Protokoll des Herstellers isoliert. Das Prinzip dieser Methode beruht auf der Adsorption von RNA-Molekülen mit mehr als 200 bp Länge an eine Säulenmatrix. Dabei handelt es sich um eine spezielle Membran auf Silicagel-Basis, welche bis zu 1 mg RNA binden kann. Der Aufschluß der *C. albicans*-Zellen erfolgte nach Aufnahme des Zellpellets in einem geeigneten Puffer durch  $3 \times 1 \text{ min}$  Vortexieren mit Hilfe von trockensterilisierten Glasperlen ( $\varnothing 0,25 \text{ mm}$ ). Nach dem Aufschließen und Homogenisieren der Zellen unter stark denaturierenden Bedingungen (Guanidinisothiocyanat,  $\beta$ -Mercaptoethanol) erfolgte in einem Zentrifugationsschritt die Adsorption der RNA an die Membran. Zu diesem Zweck besaß der Puffer einen sehr hohen Salzgehalt, außerdem wurde Ethanol zugesetzt. Nach mehreren Waschschritten erfolgte die Elution der RNA von der Säule in RNase-freiem  $\text{H}_2\text{O}$ . Konzentration und Reinheit der isolierten Gesamt-RNA wurden im Photospektrometer ( $\text{OD}_{260\text{nm}}=40 \mu\text{g}/\text{ml}$  RNA) bestimmt. Von einer ausgewählten Probe wurde aus der Gesamt-RNA mit Hilfe des Oligotex<sup>TM</sup> Direct mRNA Isolierungskits (Quiagen) die mRNA isoliert. Die verwendeten Oligotex Latex-Partikel

sind mit Oligonukleotidprimern bestehend aus 30 dT-Resten gekoppelt und ermöglichen somit die spezifische Bindung von polyA<sup>+</sup> mRNA.

#### 2.2.14 Radioaktive Markierung von Sonden-DNA

Für die radioaktive Markierung der Sonden-DNA nach der Methode des Random Priming (Feinberg und Vogelstein, 1984) wurde der "High Prime DNA Labeling Kit" (Roche Molecular Biochemicals) verwendet. Radioaktives [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP wurde von der Firma Amersham Pharmacia Biotech bezogen.

Markierungsansatz: 0,5  $\mu$ g denaturierte DNA in 8  $\mu$ l aqua dest.  
3  $\mu$ l dNTP-Mix (je 0,5 mM dATP, dGTP, dTTP)  
4  $\mu$ l High Prime Reaktionsmix (1U/ $\mu$ l Klenow-Polymerase,  
Random-Primer-Mix, 5 $\times$  Reaktionspuffer)  
5  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l)

Die Reaktion wurde 10 min bei 37°C inkubiert und danach mit 2  $\mu$ l 0,2 M EDTA (pH 8,0) abgestoppt. Mittels Zentrifugation durch Gelfiltrationssäulchen (ProbeQuant<sup>TM</sup> G-50 Micro Columns, Amersham Pharmacia Biotech) erfolgte die Abtrennung nicht eingebauter dNTP's. Vor dem Versetzen der Hybridisierungslösung mit der markierten Sonde wurde diese erneut 5 min bei 95°C denaturiert.

#### 2.2.15 Southern-Analyse

Zum Nachweis genomischer DNA-Sequenzen erfolgte eine Analyse nach Southern (1975). Genomische DNA von *C. albicans* wurde mit geeigneten Restriktionsendonukleasen geschnitten. Um einen möglichst vollständigen Verdau der genomischen DNA zu gewährleisten, wurden pro Spaltung 10 U Enzym eingesetzt und die Restriktionsansätze mindestens 6 h bei 37°C inkubiert. Danach erfolgte eine Reinigung durch Phenolextraktion. Nach der Fällung wurde die geschnittene DNA in 20  $\mu$ l aqua dest. aufgenommen und in einem 1%igen Agarosegel aufgetrennt. Dabei wurde zur späteren Größenbestimmung ein DNA-Größenstandard (1kb DNA-Ladder, Gibco BRL, Eggenstein) mitgeführt. Mit Hilfe von speziell unter UV-Licht fluoreszierenden Linealen konnten anschließend die Lauflängen der Markerfragmente bestimmt werden. Die aufgetrennte DNA wurde danach mit Hilfe eines Vakuumbloiters unter alkalischen Bedingungen (0,4 N NaOH) auf eine positiv geladene Nylonmembran (Roche Molecular Biochemicals) transferiert. Nach 4 h Vakuumtransfer wurde die Membran 1 $\times$  kurz in 6 $\times$  SSC gespült, getrocknet und die DNA durch UV-Crosslinken in einer "GS Gene Linker UV-Chamber" (Bio-Rad, Hercules, USA) auf der Membran immobilisiert. Die Hybridisierung des Southern-Blots erfolgte unter Standardbedingungen (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurde der Blot mit 50 ml Hybridisierungslösung (1 $\times$  HEPES, 10 $\times$  Denhardt's Reagenz, 100  $\mu$ g/ml denaturierte Heringssperma-DNA) in einer Plastikschale im Schüttelwasserbad bei 65°C 4 h vorhybridisiert. Anschließend wurde die Lösung durch frische Hybridisierungslösung ersetzt und die denaturierte radioaktiv

markierte Sonde zugegeben. Nach Southern-Hybridisierung für etwa 16 h bei 65°C wurde die Membran 3× 20 min bei 60°C in je 500 ml 2× SSC, 0,1% SDS gewaschen (hohe Stringenz). Die noch feuchte Membran wurde in Plastikfolie eingeschweißt und zur Exposition in eine Phosphorimagerkassette (Molecular Dynamics GmbH, Krefeld) überführt. Alternativ dazu wurden Hybridisierungssignale mit Hilfe eines Röntgenfilms (Hyperfilm MP, Amersham Pharmacia Biotech) detektiert.

5× HEPES: 0,1 M HEPES	50× Denhardt's Reagenz: 1% Ficoll
3 M NaCl	1% Polyvinylpyrrolidon
0,02 M EDTA	1% Gelatine
pH 6,8	0,5% SDS

Southern-Analysen mit heterologer genomischer DNA erfolgten unter Bedingungen niedriger Stringenz in einem formamidhaltigen Hybridisierungspuffer (0,02% Formamid, 5× SSC, 0,1% N-Lauroylsarcosin, 0,02% SDS, 2% Magermilchpulver) bei 35°C. Anschließend wurde der Southern-Blot zuerst 2× 5 min bei RT mit 5× SSC/0,1% SDS und dann 2× 15 min bei 40°C mit 2× SSC/0,1% SDS gewaschen.

### 2.2.16 Koloniehybridisierung

Zum Screening einer größeren Anzahl von Klonen auf den Erfolg eines Klonierungsexperimentes wurde die Methode der Koloniehybridisierung angewendet (Sambrook *et al.*, 1989). Dazu wurden Kolonien parallel auf eine mit einem Nylonmembran-Rundfilter (Amersham Pharmacia Biotech) belegte LB-Agarplatte sowie auf eine Referenzplatte überpickt und 16 h bei 30°C inkubiert. Die Lyse der Bakterien und der Transfer der DNA auf die Membran erfolgte nach folgendem Protokoll: Auf Saranfolie wurden 3 ml 10% SDS pipettiert und die Membran mit Hilfe von Pinzetten vorsichtig auf die Lösung gelegt, so daß die Kolonien auf der Oberseite der Membran durchfeuchtet, aber nicht verwischt wurden. Nach 3 min wurde die Membran vorsichtig abgenommen und kurz auf Filterpapier getrocknet. Es schloß sich eine 5minütige Denaturierung durch 3 ml Transferlösung 1 (0,5 N NaOH, 0,5 M NaCl) an, wobei vor der nachfolgenden 5 min Neutralisierung mittels 3 ml Transferlösung 2 (1M Tris-HCl pH 8,0, 1,5 M NaCl) wiederum kurz auf Filterpapier getrocknet wurde. Abschließend wurde die Membran für 2 min mit 2× SSC inkubiert, vollständig getrocknet und 2 min UV-fixiert. Die Hybridisierung der so vorbereiteten Nylonmembran-Rundfilter erfolgte unter Standardbedingungen.

### 2.2.17 Northern-Analyse

Die Detektion spezifischer mRNA's erfolgte mittels Northern-Analyse nach Sambrook *et al.* (1989). Gleiche Mengen Gesamt-RNA (10 bzw. 20 µg) wurden wie folgt für die Auftrennung in einem Formaldehyd-Agarosegel vorbereitet:

Ansatz: 1  $\mu$ l 10 $\times$  MOPS-Puffer  
3,5  $\mu$ l Formaldehyd  
10  $\mu$ l Formamid  
5,5  $\mu$ l RNA in DEPC-H<sub>2</sub>O

Die in einem solchen Ansatz enthaltene RNA wurde 15 min bei 65°C denaturiert, danach sofort im Eisbad abgekühlt und mit 2  $\mu$ l Formaldehydgel-Ladepuffer versetzt.

Ladepuffer: 50% Glycerol	10 $\times$ MOPS-Puffer: 0,2 M MOPS
1 mM EDTA pH 8,0	80 mM Na-acetat
0,25% Bromphenolblau	10 mM EDTA pH 8,0
0,25% Xylencyanol FF	

Das zur Auftrennung der RNA verwendete Agarosegel hatte folgende Zusammensetzung: 1% Agarose, 18% Formaldehyd in 1 $\times$  MOPS-Puffer, 1 $\mu$ g/ml Ethidiumbromid. Als Laufpuffer für die Elektrophorese wurde 1 $\times$  MOPS-Puffer verwendet. Am UV-Transilluminator wurde die Lauflänge der 18S sowie der 26S rRNA sichtbar gemacht und als Standard für die Größenbestimmung der zu detektierenden Transkripte angenommen. Damit ist eine Transkriptlängenbestimmung näherungsweise auf  $\pm 200$  bp möglich. Anschließend wurde das Gel auf eine ungeladene Nylonmembran geblottet (Hybond N; Amersham Pharmacia Biotech). Der Transfer erfolgte für 8 h auf einem Vakuumblotter mit 20 $\times$  SSC-Puffer (3 M NaCl, 0,3 M Na-Citrat, pH 7,0). Nach dem Blotten wurde die Membran kurz in 6 $\times$  SSC gespült, getrocknet und die RNA durch UV-Crosslinken auf der Membran fixiert. Die Hybridisierung des Northern Blots erfolgte unter stringenten Bedingungen. Dabei wurde allerdings die Hybridisierungsdauer auf 24-40 h erhöht. Nach dem Waschen wurden alle Northern-Blots in Plastikfolie eingeschweißt, um ein Trocknen der Filter zu vermeiden und die Rehybridisierung zu ermöglichen. Hybridisierungssignale wurden sowohl mit Hilfe eines Phosphoimagers als auch durch Exposition eines Röntgenfilms detektiert. Die quantitative Auswertung der Transkriptabundanzen wurde mit Hilfe der zum Phosphoimager gehörenden Software vorgenommen. Das Entfernen von hybridisierter Sonden-DNA von einem Northern-Blot erfolgte durch 30minütiges Waschen in 2 $\times$  SSC/0,2 N NaOH bei RT gefolgt von 5 $\times$  Spülen mit 2 $\times$  SSC und 1 $\times$  Spülen in aqua dest. Durch erneute Exposition einer Phosphoimagerkassette wurde die vollständige Entfernung der Sonden-DNA überprüft.

## 2.3 Transformation

### 2.3.1 Transformation von *E. coli*

Die Transformation von *E. coli* erfolgte entweder basierend auf der in Sambrook *et al.* (1989) angegebenen CaCl<sub>2</sub>-Methode oder durch Elektroporation (Shikegawa und Dower, 1988, Dower *et al.*, 1988, Calvin und Hannawalt, 1988). Kompetente Zellen für beide

Transformationsmethoden wurden im Gemisch mit 10% Glycerin bis zu 6 Monate bei -70°C gelagert. Zu 100 µl CaCl<sub>2</sub>-kompetenten Zellen wurden 4-10 µl Ligat gegeben und 45 min im Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 5 min bei 37°C bzw. 2 min bei 42°C wurden die Zellen nochmals 2 min auf Eis gestellt und danach mit 0,9 ml vorgewärmtem SOC-Medium versetzt. Das Ausplattieren von Aliquots auf Selektivplatten erfolgte nach 1 h Schüttelinkubation bei 37°C. Die Elektroporation von elektrokompetenten Zellen erfolgte in einem GenePulser (BioRad) unter folgenden Bedingungen: 0,2 mm Küvette (Eurogentec, Herstal, Belgien), C=25 µF, R=200 Ω, U=2,5 kV. Nach dem Puls wurden die Zellen wie bereits beschrieben in SOC-Medium aufgenommen und weiterbehandelt.

### 2.3.2 Transformation von *S. cerevisiae*

Die Transformation von *S. cerevisiae* erfolgte mit Lithiumacetat-behandelten Zellen nach einer Methode von Schiestl und Gietz (1989). Von einer Übernachtskultur in YPD wurde eine Hauptkultur (100 ml YPD) auf eine Dichte von  $2,5 \times 10^6$  Zellen/ml angeimpft. Nach dem Wachstum bis auf  $1 \times 10^7$  Zellen/ml wurde die Kultur bei RT pelletiert und 1× mit 25 ml H<sub>2</sub>O gewaschen. Dann erfolgte die Aufnahme des Pellets in 0,5 ml frisch hergestellter TE/LiAc-Lösung (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, 0,1 M Li-Acetat, pH 7,5). Zur Transformation wurden 0,1-1 µg Plasmid-DNA mit 100 µg Carrier-DNA (Heringsperma- oder Kalbsthymus-DNA in 1× TE gelöst, geschert und denaturiert) gemischt und 100 µl kompetente Zellen dazugegeben. Nach Zugabe von 0,6 ml frisch hergestellter PEG/TE/LiAc-Lösung (TE/LiAc, 40% PEG 4000) und Mischung durch Vortexieren wurden die Zellen für 30 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 70 µl DMSO sowie ein 15minütiger Hitzeschock bei 42°C. Nachdem die Zellen kurz auf Eis abgekühlt worden waren, wurden sie entweder direkt ausplattiert oder zuvor kurz abzentrifugiert und in 0,5 ml TE resuspendiert.

### 2.3.3 Transformation von *C. albicans*

Die Transformation von *C. albicans* erfolgte modifiziert nach einer Sphäroplasten-Transformationsmethode (Kurtz *et al.*, 1986). Zellen einer 100 ml Übernachtskultur in YNB-Medium (plus Uridin) wurden abzentrifugiert und 3× in Lösung 1 (1M Sorbitol, 10 mM Tris-HCl pH 8,0, 1M EDTA) gewaschen. Danach wurden die Zellen in 20 ml Lösung 2 (Lsg. 1 plus 50 mM DTT) aufgenommen und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgte eine Waschung in Lösung 3 (1 M Sorbitol, 0,1 M Na-Citrat pH 5,8, 10 mM EDTA). Zur Sphäroplastierung wurde das Zellpellet in 20 ml Lösung 3 aufgenommen und 0,5 mg Zymolyase (Mobitec, Hamburg) zugegeben. Die Suspension wurde dann bei 30°C unter Schütteln inkubiert und nach 1 h auf den Grad der Protoplastierung bzw. Sphäroplastierung untersucht. Wenn mehr als 50% Protoplasten im Mikroskop sichtbar waren, wurden die Zellen zur Transformation eingesetzt. Dazu wurden die Protoplasten und Sphäroplasten durch vorsichtiges Zentrifugieren für 5 min bei 2300 rpm und 4°C pelletiert. Anschließend erfolgten 3 Waschungen mit 20 ml Lösung 1. Nach dem letzten



Zentrifugationsschritt wurde das Pellet in 400  $\mu$ l derselben Lösung aufgenommen und auf Eis gestellt. Zur Transformation wurden 200  $\mu$ l der Suspension mit 10-20  $\mu$ g DNA in 10  $\mu$ l aqua dest. gemischt und 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation erfolgte unter folgenden Bedingungen: 0,2 cm Küvette,  $U=1,5$  kV,  $R=200$   $\Omega$ ,  $C=25$   $\mu$ F. Nach dem Puls wurden die Zellen in 1 ml Regenerationsmedium (1 M Sorbitol, 2% Glukose, 0,7% YNB) aufgenommen und 1 h bei 37°C unter Schütteln inkubiert. Von dieser Kultur wurden je 100–150  $\mu$ l pro Platte auf Selektivmedium (YNB- bzw. Sabouraud-Medium ohne Uridin) ausgespatelt. Als Kontrolle für die Vitalität der Zellen nach der Elektroporation diene eine Platte des entsprechenden Mediums mit Uridin. Nach 2–4 Tagen Inkubation bei 28°C waren die jeweiligen Transformanten auf den Selektivplatten zu gut erkennbaren Einzelkolonien herangewachsen.

## 2.4 Analyse von Proteinen

### 2.4.1 Herstellung von Lysaten aus Hefen

*C. albicans* oder *S. cerevisiae*-Zellen aus der späten logarithmischen Phase einer YPD-Kultur wurden pelletiert durch 10 min Zentrifugation bei 4800 rpm, 1 $\times$  mit PBS-Puffer (140 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,8 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,3) gewaschen und in 2 Volumen Lysispuffer (15 mM HEPES pH 7,5, 0,1 M KCl, 3 mM EGTA, 10% Glycerin) aufgenommen. Der Aufschluß der Zellen wurde durch 3 $\times$  1minütiges Vortexieren in einem Bead-Beater (Biospec Products, Bartlesville, USA) mit Hilfe von Glasperlen ( $\varnothing$  0,25 mm) und in Gegenwart von Proteaseinhibitoren (complete<sup>TM</sup> Protease Inhibitor Cocktail (Roche Molecular Biochemicals), 1 mM PMSF) erreicht. Die Lysate wurden bei 750 $\times$ g bzw. 4800 $\times$ g zentrifugiert, um Zelltrümmer und Rohextrakt zu trennen. Anschließend wurden aus den Überständen durch 30 min Ultrazentrifugation bei 100 000 $\times$ g cytosolische Fraktion (S100) und Membranfraktion (P100) gewonnen (Ultrazentrifuge L70 mit Rotor Ti 70.1, Beckman, München). Die Proteinwertbestimmung erfolgte mit der Bio-Rad D<sub>C</sub> Protein-Assay-Lösung nach der Methode von Lowry (1951) oder mit Hilfe der Roti-Quant-Lösung (Roth, Karlsruhe) nach der Methode von Bradford (1976). In beiden Fällen erfolgte zunächst die Aufnahme einer Eichkurve mit BSA.

### 2.4.2 Heterologe Expression von CaVps34p in *E. coli*

Die Überexpression von CaVps34p in *E. coli* erfolgte mit Hilfe des QIAexpress-Systems (Quiagen). *CaVPS34* wurde dazu im richtigen Leserahmen in den Vektor pQE9 kloniert, um bei der Expression eine N-terminale Fusion mit dem Polyhistidin-Peptid (HisTag) zu erreichen. Das resultierende Plasmid pVPEX1 wurde in *E. coli* M15 [pREP4] transformiert. Das Plasmid pREP4 ermöglicht dabei durch Überexpression des *lac*-Repressors die stringente Kontrolle der Transkription am T5-Promotor von pQE-Plasmiden. IPTG induziert die Expression rekombinanter Proteine durch Inaktivierung des *lac*-Repressors.

Die Expression von *CaVPS34* wurde zunächst nach dem vom Hersteller angegebenen

Standardprotokoll in 2× YT-Medium induziert. Nach Zugabe von 1 mM IPTG bei einer  $OD_{600}=0,6$  wurden sofort sowie nach 2 h und 4 h Wachstum bei 37°C Proben entnommen. Aus diesen Proben wurden Lysate zur nativen Proteinaufreinigung hergestellt. Das Zellpellet einer solchen Probe wurde in Lysispuffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, 10% Glycerin, 0,1% NP40, 1mM PMSF, pH 8,0) aufgenommen, 2× in flüssigem Stickstoff schockgefroren sowie 2× mit Ultraschall behandelt. Die anschließende Aufreinigung des HisTag-Proteins erfolgte affinitätschromatografisch unter Verwendung von Ni-NTA-Agarose. Zur Bindung des überexprimierten HisTag-Proteins an die Chelatormatrix wurden 1 ml 50% Ni-NTA Agarose und 4 ml Lysat vermischt und 60 min bei 4°C unter leichtem Schütteln (200 rpm) inkubiert. Es folgte das Laden der Mixtur auf eine Säule, wobei der Durchfluß zur späteren Analyse aufgefangen wurde. Nach zweimaligem Waschen mit Puffer (50 mM  $NaH_2PO_4$ , pH 8,0, 300 mM NaCl, 20 mM Imidazol) und Sammeln der Fraktionen wurde durch Erhöhung der Imidazolkonzentration im Puffer auf 250 mM das gebundene HisTag-Protein eluiert. Diese Elution mit 0,5 ml Puffer erfolgte insgesamt viermal. Aliquots aller Fraktionen wurden anschließend auf ein 10%iges SDS-PAA-Gel aufgetragen.

### 2.4.3 Westernblot-Analyse zum Nachweis spezifischer Proteine

Die Auftrennung von Proteinen erfolgte mittels SDS-PAGE in einem diskontinuierlichen Lämmli-System (Lämmli, 1970). Es wurden 4%ige Sammelgele und 7,5 bzw. 10%ige Trenngele verwendet. Die Proteinproben wurden vor dem Auftragen mit Probenpuffer (RotiLoad, Roth) versetzt und 5 min bei 95°C denaturiert. Als Molekulargewichtsstandard wurde der vorgefärbte Marker SeeBlue™ (Novex, San Diego, USA) oder eine combithek-Eichproteinmischung (Roche Molecular Biochemicals) mitgeführt. Das Anfärben der Proteinbanden erfolgte mittels Coomassie-Färbung (0,1% Coomassie Brilliant Blue, 10% Eisessig, 50% MetOH). Bei Proteingelen, die geblottet werden sollten, wurde auf die Färbung verzichtet. Der Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran (Protran BA83, Schleicher & Schüll, Dassel) erfolgte im Tankblot-Verfahren in einer Mini-Trans-Blot-Zelle (Mini-Protean-System, Bio-Rad) für 4 h bei 80 V, 100 mA. Zuvor wurde die Membran 10 min in Blotpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 20% Methanol) äquilibriert. Nach dem Blotten erfolgte die Inkubation der Membran in Blockierungslösung (2,5% BSA bzw. 5% Magermilchpulver in PBS-Puffer). Anschließend wurde der Blot mehrmals in PBS-T (0,1 M  $NaH_2PO_4$ , 0,1 M NaCl, pH 7,5, 0,1% Tween 20) gewaschen. Der Primärantikörper wurde in frischer Blockierungslösung verdünnt. Die Antikörperbindung erfolgte 1 h bei RT unter leichtem Schütteln oder Taumeln. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in PBS erfolgte die Inkubation mit dem Sekundärantikörper wiederum 1h bei RT. Daran schloß sich erneut das mehrmalige Waschen der Membran an, wonach die Detektion mit dem ECL-System (Enhanced Chemiluminescence, Amersham Pharmacia Biotech) auf einem Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) nach den Angaben des Herstellers erfolgte.

- Primärantikörper: ○ Anti-HisTag, Maus, monoklonal, 1:1000 (Qiagen)  
○ Anti-CaVps34p, Kaninchen, polyklonal, 1:100 (Eurogentec)

- Sekundärantikörper: ○ Anti-Maus, Ziege, polyklonal, konjugiert mit Meerettich-Peroxidase, 1:10 000 (Sigma)  
○ Anti-Kaninchen, Esel, polyklonal, konjugiert mit Meerettich-Peroxidase, 1:10 000 (Amersham Pharmacia Biotech)

#### **2.4.4 Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität und Bestimmung der Substratspezifität von CaVps34p**

Die Bestimmung der PI3-Kinase-Aktivität erfolgte wie in der Literatur beschrieben (Schu *et al.*, 1993). Etwa 0,15  $\mu\text{g}$  des affinitätsgereinigten rekombinanten Proteins wurden in 50  $\mu\text{l}$  Reaktionen analysiert. Zur Kontrolle wurde die PI3-Kinase p110 $\gamma$  aus Humanzellen (Stoyanov *et al.*, 1995) im Assay mitgeführt (GST-p110 $\gamma$ -Präparation von R. Heinze bzw. I. Rubio). Die Reaktionsansätze enthielten 20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mg/ml ultraschallbehandeltes Phosphatidylinositol, 60  $\mu\text{M}$  ATP und 0,1  $\mu\text{Ci/ml}$  [ $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ ]ATP. Für die Bestimmung der Substratspezifität von CaVps34p wurde entweder PI(3), PI(4)P, PI(4,5) $\text{P}_2$  oder ein Gemisch aus allen drei potentiellen Substraten eingesetzt. Die Reaktionen wurden 5-15 min bei 28°C bzw. 37°C inkubiert und durch Zugabe von 80  $\mu\text{l}$  1 M HCl abgestoppt. Daran schloß sich die Extraktion der Lipide mit 160  $\mu\text{l}$  Chloroform/Methanol (1:1, v/v) an. Die organische Phase wurde 1 $\times$  mit HCl gewaschen, getrocknet und in Chloroform aufgenommen. Anschließend wurden die Proben auf vorbehandelte Silica 60 TLC Platten (Merck, Darmstadt) aufgetragen und in einem Boratpuffersystem (Walsh *et al.*, 1991) entwickelt. Dieses System ermöglicht die Unterscheidung von PI(3)P und PI(4)P. Für die Auftrennung von PI(3)P, PI(3,4) $\text{P}_2$  bzw. PI(3,4,5) $\text{P}_3$  wurden Silica 60 TLC Platten mit Oxalat besprüht und folgendes Laufmittelsystem verwendet:  $\text{H}_2\text{O}$ -Essigsäure-Methanol-Aceton-Chloroform (7:12:13:15:40, v/v/v/v/v). Radioaktiv markierte Lipidspezies wurden mit Hilfe eines Phosphoimagers (Bio-Rad GS-250 Molecular Imager<sup>TM</sup>) oder Röntgenfilmes detektiert.

#### **2.4.5 Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität in Lysaten von *C. albicans***

Jeweils 4  $\mu\text{g}$  Gesamtprotein der einzelnen Fraktionen (P100, S100) der Lysate von *C. albicans* SC5314, CAV3 sowie als Kontrolle von *S. cerevisiae* CEN.PK2 wurden, wie für gereinigtes CaVps34p beschrieben, in einem PI3-Kinase-Assay untersucht.

#### **2.4.6 Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p**

Zur Untersuchung der Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p im *in vitro*-Assay wurde das gereinigte HisTag-Fusionsprotein zunächst umgepuffert, da der für die Elution von der Ni-NTA-Säule verwendete Na-Phosphat/Imidazolpuffer die Reaktion beeinträchtigen kann. Es zeigte sich, daß das Protein gegenüber der Dialyse sehr empfindlich ist,

so daß Konzentrationssäulchen (Ultrafree-0.5, Ausschlußgröße 50 KDa, Millipore, USA) verwendet wurden, um den Na-Phosphat/Imidazolpuffer schrittweise herauszuverdünnen. Durch Zentrifugation bei  $12\,000\times g$  unter Kühlung konnte das Protein sehr schnell aufkonzentriert werden. Danach wurden die Proben mit Proteinkinasepuffer wieder bis zum Ausgangsvolumen aufgefüllt. Diese Prozedur wurde einmal wiederholt, um Reste des Elutionspuffers noch weiter zu entfernen. Zur Stabilisierung des Proteins wurden 10% Glycerin, 0,1% Cholat bzw. 0,1% Cholat und 0,1% BSA zugegeben.

Der Autophosphorylierungsansatz enthielt den Reaktionspuffer (20 mM HEPES, pH 7,4, 10 mM  $MnCl_2$ ), 200 ng-1  $\mu g$  des gereinigten Proteins, 25  $\mu M$  ATP sowie 0,1  $\mu Ci/ml$  [ $\gamma$ - $^{32}P$ ]ATP (Amersham Pharmacia Biotech). Die Reaktion wurde nach 30 min Inkubation bei 30°C durch die Zugabe von 12,5  $\mu l$  5 $\times$  Probenpuffer abgestoppt. Vor dem Auftragen der Proben auf ein 10%iges PAA-Gel erfolgte eine 10minütige Denaturierung bei 95°C. Nach der elektrophoretischen Auftrennung erfolgte die Sichtbarmachung der Proteinbanden durch Coomassie-Färbung. Anschließend wurde das Gel getrocknet und autoradiografisch ausgewertet.

#### **2.4.7 Bestimmung der Gesamtaktivität der Carboxypeptidase Y in *C. albicans*-Stämmen**

Die Carboxypeptidase Y-Aktivität von *C. albicans* Wildtyp- und Mutantenstämmen wurde mittels eines Mikrotiterplattentests nach Woolford *et al.* (1986) bestimmt. Dazu wurden auf YPD-Agar gewachsene Kolonien in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 resuspendiert. Nachdem die einzelnen Gefäße der Mikrotiterplatte mit 0,2 ml einer Lösung aus 0,5 mg BTPNA (N-Benzoyl-L-tyrosin *p*-Nitroanilid, Sigma) in 0,1 M Tris-HCl, pH 7,5 und 20% DMF gefüllt worden waren, erfolgte die Zugabe von  $5\times 10^7$  Zellen des jeweiligen Stammes und die Inkubation der Gemische über Nacht bei 34°C. Danach wurden die Zellen durch Zentrifugation (5 min, 4800 rpm) pelletiert. Da CPY die Amidbindung in BTPNA spaltet, so daß das gelbe Reaktionsprodukt *p*-Nitroanilin gebildet wird, konnte im zellfreien Überstand die CPY-Aktivität durch Messung der Absorption bei 410 nm mittels eines Titertek Multiskan MCC/340 Spektrophotometers (Labsystems, Helsinki, Finnland) quantitativ erfaßt werden.

## **2.5 Morphologische Untersuchung von *C. albicans*-Stämmen**

### **2.5.1 Fluoreszenzfärbung und -mikroskopie**

Zellen aus einer Übernachtskultur in Sabouraud-Medium wurden durch 5 min Abzentrifugieren bei 4800 rpm geerntet und zweimal in 0,9 M NaCl gewaschen.  $10^6$  Zellen wurden in Puffer (10 mM HEPES pH 7,4, 5% Glucose) resuspendiert. Die Fluoreszenzfärbung des Vakuolenlumens wurde mit dem membranpermeablen Cumarin-Derivat CellTracker Blue CMAC (7-amino-4-chloromethylcumarin, Molecular Probes, Eugene, USA) in einer Endkonzentration von 100  $\mu M$  durchgeführt. Nach einer 30minütigen Inkubation bei

Raumtemperatur wurden die Zellen direkt im Fluoreszenzmikroskop betrachtet (Axioplan 1, Zeiss, Jena). Dabei wurde ein multiples Filterset ( $\lambda_{\text{exc}}=400$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm, Zeiss) verwendet.

Die Pulse-Chase-Experimente mit dem fluoreszenten Endocytosemarker FM4-64 [N-(3-triethylammoniumpropyl)-4-(p-diethylaminophenyl)hexatrienyl]pyridiniumdibromid] (Molecular Probes) wurde wie in der Literatur beschrieben durchgeführt (Vida und Emr, 1995). *C. albicans* SC5314 und CAV3 wurden über Nacht in YPD-Medium bei 28°C kultiviert. Danach wurden Zellen dieser Kultur in frisches Medium überimpft, so daß die Kultur eine  $\text{OD}_{600}=0,3$  hatte. Nach Inkubation der Kultur bis zu einer  $\text{OD}_{600}=0,9$  wurden die Zellen abzentrifugiert und in frischem YPD resuspendiert. Zu  $2 \times 10^6$  Zellen wurde der Farbstoff FM4-64 aus einer 8 M Stammlösung in DMSO in einer Endkonzentration von 40  $\mu\text{M}$  hinzugegeben und der Ansatz 30 bzw. 60 min bei 30°C unter Schütteln inkubiert. Als Kontrolle dafür, daß es sich tatsächlich um einen energieabhängigen Prozeß handelt, wurde die Färbung außerdem bei 4°C durchgeführt. Nach dem Puls wurden die Zellen abzentrifugiert, in frischem YPD-Medium aufgenommen und wiederum inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten erfolgte die mikroskopische Kontrolle der Transportprozesse. Dazu wurden die Zellen auf unbeschichtete Objektträger aufgebracht oder durch einen dünnen 1% Agarosefilm arretiert. Der Transport des lipophilen Fluoreszenzfarbstoffes wurde unter Nutzung eines geeigneten Filtersets ( $\lambda_{\text{exc}}=546$  nm,  $\lambda_{\text{em}}=575\text{--}640$  nm) am Fluoreszenzmikroskop verfolgt. Parallel zu allen Fluoreszenzaufnahmen wurden die Zellen jeweils im differentiellen Interferenzkontrast betrachtet.

### 2.5.2 Präparation für die Rasterelektronenmikroskopie

*C. albicans*-Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden pelletiert und  $3 \times$  mit Puffer (0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , pH 7,0) gewaschen. Für die Fixierung wurde das Pellet mit 0,5 % Glutaraldehyd in Puffer resuspendiert und 30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut abzentrifugiert,  $3 \times$  mit Puffer gewaschen und in frischem Puffer resuspendiert. Es folgte die Nachfixierung mit 1%  $\text{OsO}_4$  sowie die Entwässerung und Goldbedampfung der Proben (H. Gentner, IMB Jena). Die rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen wurden an einem Rasterelektronenmikroskop FESM LEO 1530 (LEO, Oberkochen) im SE-Modus mit einer Beschleunigungsspannung von 1,5 kV und einem Arbeitsabstand von 3 mm gemacht (K. Augsten, IMB Jena).

### 2.5.3 Präparation für die Transmissionselektronenmikroskopie

*C. albicans* SC5314 und CAV3 wurden in Sabouraud-Medium bis in die mittlere logarithmische Phase kultiviert bzw. zur Hypheninduktion in Sabouraud-Medium mit 10% FCS inkubiert. Die Zellen wurden abzentrifugiert, mit aqua dest. gewaschen und verschiedenen Fixierungs- und Kontrastierungsprotokollen unterworfen:

$\text{KMnO}_4/\text{OsO}_4$ -Methode nach Weber *et al.* (1979): Die Zellen wurden in  $\text{H}_2\text{O}$  resuspendiert und sofort 15 min in 2% (w/v)  $\text{KMnO}_4$  fixiert, dann  $5 \times$  in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen und 1h in

1% gepufferter  $\text{OsO}_4$ -Lösung in 0,1 M  $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{Na}_2\text{HPO}_4$  Puffer (pH 7,0) nachfixiert. Auf 3 Waschungen in  $\text{H}_2\text{O}$  folgte für  $2 \times 1$  h die Färbung mit 0,5% Uranylacetat sowie die Waschung der Zellen wie bereits beschrieben. Alle Prozeduren wurden bei Raumtemperatur ausgeführt.

Hefe-Sphäroplasten-Färbetechnik nach Banta *et al.* (1988): Die Zellen wurden gewaschen und 2 h bei Raumtemperatur in 2 ml 0,1 M Na-cacodylat, pH 6,8, 5 mM  $\text{CaCl}_2$  (Puffer A), 3% Glutaraldehyd fixiert. Die fixierten Zellen wurden  $1 \times$  in 100 mM Tris-HCl pH 8,0, 25 mM DTT, 5 mM  $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ , 1,2 M Sorbitol gewaschen und danach 10 min im gleichen Puffer inkubiert. Für die Sphäroplastierung wurden die Zellen zentrifugiert,  $1 \times$  in 1 ml 0,1 M K-Phosphat pH 5,8, 1,2 M Sorbitol gewaschen und in 0,5 ml des gleichen Puffers, zusätzlich 0,05 ml  $\beta$ -Glucuronidase Typ H2 (Sigma) und 2,5 mg Zymolyase enthaltend, resuspendiert. Die Zellsuspension wurde 2 h bei  $30^\circ\text{C}$  inkubiert. Anschließend wurden die Sphäroplasten vorsichtig abzentrifugiert und in 1 ml Puffer A gewaschen, resuspendiert in 0,5 ml 1%  $\text{OsO}_4$ , 1% K-Ferrocyanid in Puffer A und 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 4 Waschungen in  $\text{H}_2\text{O}$  wurden die Zellen in 1% Thiocarbohydrazid resuspendiert, 5 min bei RT inkubiert und wiederum  $4 \times$  in  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen. Die Färbung der Zellen erfolgte mit 1%  $\text{OsO}_4$ , 1% K-Ferrocyanid in Puffer A für 3 min bei RT gefolgt von  $\text{H}_2\text{O}$ -Waschungen wie zuvor. Alle Proben wurden in einen dünnen Agarfilm eingebettet. Nach Entwässerung in einer Aceton-Serie wurden die Proben seriell in Aceton-Vestopal-Mischungen (3:1, 1:1, 1:3) überführt und schließlich in reines Vestopal eingebettet. Das Auspolymerisieren der Proben erfolgte für 24 h bei  $60^\circ\text{C}$ . Ultradünnschnitte dieser Proben wurden auf Kupfer-Netzblenden gesammelt, 45 s mit Bleicitrat nachkontrastiert und an einem Transmissionselektronenmikroskop (TEM 420, Philips Electronic Instruments Inc., Mahwah, USA) betrachtet und fotografiert (C. Hermann, IMB Jena).

## 2.6 Untersuchung der Adhäsion von *C. albicans* an Fibroblasten

Der Adhärenz-Fluoreszenz-Test wurde auf der Grundlage eines von Borg-von Zepelin *et al.* (1995) beschriebenen Verfahrens durchgeführt. Zellen aus einer Übernachtskultur in Sabouraud-Medium wurden gewaschen und in frisches Medium mit 10% FCS überführt.  $2 \times 10^6$  Zellen/ml wurden 1 h bei  $37^\circ\text{C}$  vorinkubiert. Die verwendeten Maus-Fibroblastenzellen L929 wurden von H.-M. Dahse (HKI, Abt. Wirkstoffprüfung) zur Verfügung gestellt. Mikrotiterplatten mit  $1 \times 10^4$  adhärenzten Fibroblastenzellen wurden  $1 \times$  mit  $1 \times$  PBS-Puffer gewaschen und dann mit 200  $\mu\text{l}$  *Candida*-Suspension beschickt. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bzw. 4 h bei  $37^\circ\text{C}$  (feuchte Kammer zum Schutz vor Austrocknung) erfolgte das Anfärben der *Candida*-Zellen durch die Zugabe von 25  $\mu\text{g/ml}$  Calcofluor White MR2 (Molecular Probes) und eine anschließende Inkubation für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ . Nicht adhärenzte *Candida*-Zellen wurden danach durch  $2 \times$  Waschen mit  $1 \times$  PBS entfernt. Schließlich wurde die Anzahl der adhärenzten Zellen durch Fluoreszenzmessung in einem automatisierten Fluoreszenz-Reader (Fluoroskan, Labsystems) unter Verwendung eines Filters mit  $\lambda_{\text{exc}}=360$  nm und  $\lambda_{\text{em}}=460$  nm bestimmt.

## 2.7 Untersuchung der Virulenz von *C. albicans* im Tiermodell

Für die Virulenztests im Hühnerembryomodelle bzw. im Maus-Candidosis-Modell wurden die zu untersuchenden *C. albicans*-Stämme in Sabouraud-Medium bis zur späten logarithmischen Phase kultiviert, dann  $3\times$  mit 0,9 M NaCl gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1\times 10^8$ /ml eingestellt.

Alle Tierversuche einschließlich der Organentnahme wurden in der Abteilung Wirkstoffprüfung des HKI unter Leitung von A. Härtl vorgenommen. Die Durchführung der Infektionsversuche am embryonierten Hühnerei erfolgte wie in Härtl *et al.* (1995) dargestellt. Es wurden 10 Tage alte bebrütete Eier verwendet. Durch Inokulation der *Candida*-Zellen in die Chorioallantoismembran (CAM), die den Kontakt zwischen Außenmilieu und embryonalem Blutgefäßsystem darstellt, wurde eine systemische *Candida*-Infektion ausgelöst. Die applizierte Infektionsdosis des jeweiligen Stammes betrug  $10^7$  Blastosporen pro Hühnerei. Parallel dazu wurden als Kontrolle einige Eier einer Scheinbehandlung unterzogen. Die infizierten oder scheinbehandelten Eier wurden anschließend weiterbebrütet und bis zum 8. Tag täglich auf das Überleben der Embryonen kontrolliert.

Die Untersuchungen im Maus-Candidosis-Modell verliefen wie folgt: Es wurden sechs Wochen alte männliche NMRI-Mäuse (Harlan-Winkelmann, Borcheln) eingesetzt, die zu je fünf Tieren in einem Käfig gehalten und jeden Tag kontrolliert wurden. Die Applikation der Keime erfolgte in  $200\ \mu\text{l}$  0,9 M NaCl in die laterale Schwanzvene der Tiere. Dabei wurden jeweils fünf Mäuse pro Versuch mit derselben Anzahl an Keimen inokuliert. Die pro Tier gewählten Keimzahlen betrugen  $5\times 10^6$ ,  $5\times 10^5$  und  $5\times 10^4$ . Als Kontrolle wurde fünf Mäusen  $200\ \mu\text{l}$  Puffer gespritzt. Über den gesamten Verlauf der Versuche von jeweils drei Wochen wurden die Mäuse regelmäßig gewogen und äußerlich auf ihren Gesundheitszustand untersucht. Es wurden insgesamt drei zeitlich unabhängige Versuche durchgeführt. Zum statistischen Vergleich der Überlebenskurven der Mäuse wurde der "log-rank"-Test (Peto *et al.*, 1977) angewendet.

Für die Quantifizierung der Nierenbesiedlung durch *C. albicans* wurden die Mäuse drei bzw. 20 Tage nach Beginn des Experimentes getötet und ihre Nieren unter sterilen Bedingungen herauspräpariert. Diese wurden gewogen, in 3 ml 0,9 M NaCl aufgenommen, anschließend mit einem Ultra-Turrax T25 (IKA Labortechnik, Staufen) zermörsert und in verschiedenen Verdünnungen auf YPD-Agar ausplattiert. Durch Auszählen der nach zwei bis drei Tagen gewachsenen Kolonien konnte die *Candida*-Keimzahl in den Nieren festgestellt werden. Außerdem wurde homogenisiertes Nierengewebe mit 10% Formaldehyd fixiert, die darin enthaltenen *C. albicans*-Zellen mit 25 mg/ml Calcofluor angefärbt und unter dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

# 3. Ergebnisse

## 3.1 Genomische Organisation von CaVPS34

Als Voraussetzung für weitere Untersuchungen wurde zunächst die genomische Organisation von *CaVPS34* im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 näher charakterisiert. Es ergab sich dabei die Frage, ob zwischen den beiden Allelen des Gens im diploiden Genom von *C. albicans* ein Polymorphismus besteht bzw. ob *CaVPS34* eventuell in einer höheren Kopienzahl im *C. albicans*-Genom vorliegt.

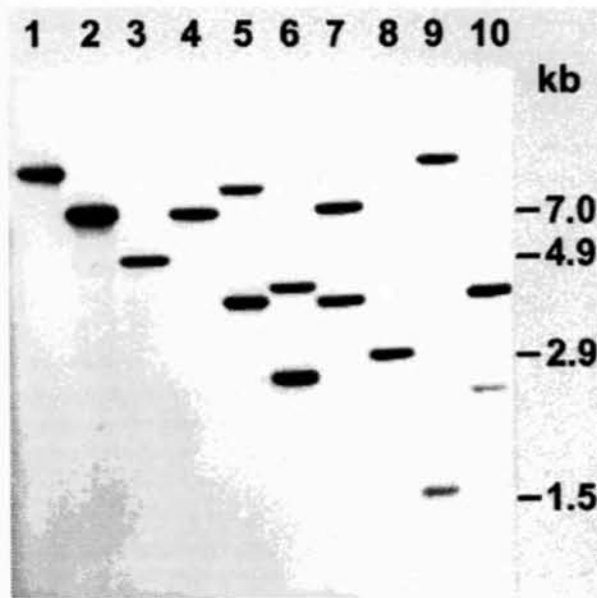
Für diese Analyse wurde genomische DNA des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 mit verschiedenen Restriktionsenzymen geschnitten und durch Southern-Hybridisierung mit der geninternen 2,9 kb *BsmI*-Sonde von *CaVPS34* charakterisiert. Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden so ausgewählt bzw. kombiniert, daß das resultierende Hybridisierungsmuster eine eindeutige Aussage über die genomische Organisation von *C. albicans* zuließ. Nur außerhalb der kodierenden Sequenz des Gens schneidende Restriktasen (*EcoRI*, *PstI*, *HindIII*), Restriktasen mit einer einzigen (*XbaI*, *BglII*, *BspHI*) oder auch mit zwei Schnittstellen in *CaVPS34* (*BsmI*) wurden jeweils einzeln eingesetzt oder aber in Doppelspaltungen kombiniert (*EcoRI/HindIII*, *EcoRI/XbaI*, *HindIII/XbaI*). Anzahl und Größe der erwarteten Fragmente konnten aus der vorhandenen Sequenzinformation (4,9 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment, EMBL-Genbank #Y09043) und mit Hilfe zusätzlicher Informationen aus der Restriktionsanalyse des Plasmides pKE1 (enthält *CaVPS34* auf 7,0 kb *EcoRI*-Fragment genomischer DNA) abgeschätzt werden (Tab. 3.1).

Das in Abbildung 3.1 dokumentierte Hybridisierungsmuster zeigt, daß *CaVPS34* in nur einer einzigen Kopie pro haploidem Genom vorliegt, da Größe und Anzahl der jeweils

Restriktasen	Hybridisie- rungsbanden (kb)	erwartete Fragmente	
		Anzahl	Größe (kb)
<i>PstI</i>	8,5	1	≥ 7,0
<i>EcoRI</i>	7,0	1	7,0
<i>EcoRI/HindIII</i>	4,9	1	4,9
<i>HindIII</i>	7,0	1	≥ 4,9
<i>XbaI</i>	4,2; 7,5	2	≥ 2,3; ≥ 2,6
<i>EcoRI/XbaI</i>	2,6; 4,4	2	2,6; 4,4
<i>BglII</i>	4,2; 7,2	2	≥ 2,1; ≥ 2,8
<i>BsmI</i>	2,9	1	2,9
<i>BspHI</i>	1,5; > 10	2	1,5; ≥ 2,3
<i>HindIII/XbaI</i>	2,3; 4,3	2	2,3; ≥ 2,6

**Tab. 3.1: Erwartete und tatsächliche Fragmentgrößen der Southern-Analyse von *CaVPS34* in *C. albicans* SC5314.** Der Vergleich zeigt, daß *CaVPS34* pro haploidem Genom von *C. albicans* nur als Einzelkopie vorliegt.





**Abb. 3.1: Southern-Analyse von *CaVPS34* in genomischer DNA von *C. albicans* SC5314.** Folgende Restriktasen wurden verwendet: *Pst*I (1), *Eco*RI (2), *Hind*III/*Eco*RI (3), *Hind*III (4), *Xba*I (5), *Eco*RI/*Xba*I (6), *Bgl*II (7), *Bsm*I (8), *Bsp*HI (9), *Xba*I/*Hind*III (10). Der Blot wurde mit dem internen *Bsm*I-Fragment von *CaVPS34* hybridisiert.

detektierten Hybridisierungssignale genau den Erwartungen für ein "single-copy"-Gen entsprachen (vgl. Tab. 3.1). Auf das diploide *C. albicans*-Genom bezogen läßt dies die Aussage zu, daß die beiden Allele von *CaVPS34* dem erhaltenen Bandenmuster zufolge keinen Polymorphismus aufweisen. Spaltungen, bei denen die Restriktionsorte außerhalb der kodierenden Sequenz lagen, ergaben genau ein Signal. Befand sich einer der Orte innerhalb der kodierenden Sequenz, so wurden zwei Banden detektiert. Außerdem konnten die Größen der Banden mit den vorhandenen Sequenzdaten sowie relativ zueinander in Übereinstimmung gebracht werden (Tab. 3.1). Da als Sonde das 2,9 kb *Bsm*I-Fragment von *CaVPS34* verwendet wurde, ergab die Hybridisierung mit der *Bsm*I-geschnittenen DNA wie erwartet genau diese eine *CaVPS34*-interne 2,9 kb-Bande. Weiterhin wird deutlich, daß unter den gewählten stringenten Hybridisierungsbedingungen kein zu *CaVPS34* hochhomologes Gen in *C. albicans* nachgewiesen werden konnte. Für die geplante Disruption von *CaVPS34* bedeutete das Ergebnis der Southern-Analyse, daß zur Herstellung einer *CaVPS34*-Nullmutante zwei *CaVPS34*-Allele ausgeschaltet werden mußten.

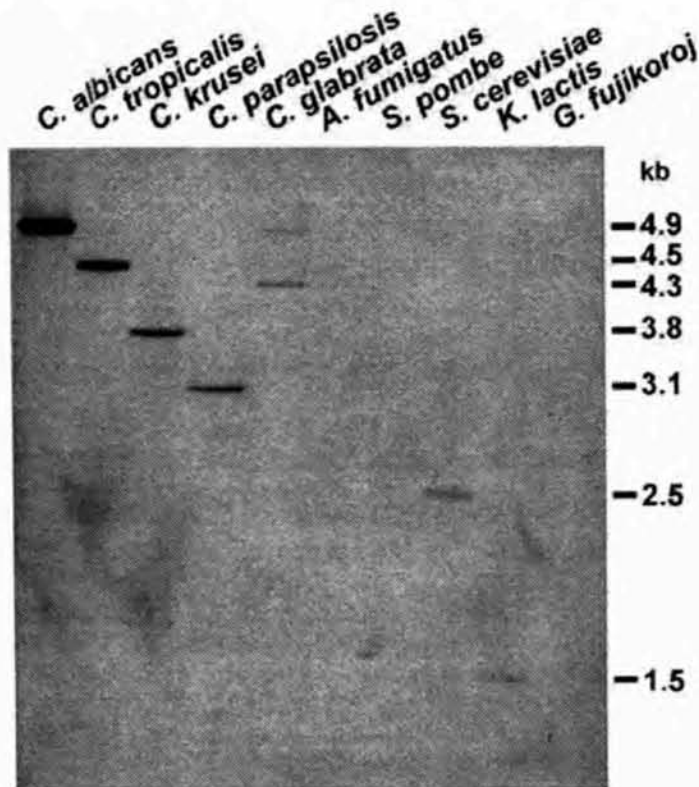
### 3.2 Nachweis von *CaVPS34*-homologen Sequenzen in weiteren Pilzstämmen

In einer Reihe eukaryotischer Organismen existieren zu *S. cerevisiae VPS34* homologe Gene (vgl. 1.3). Das legte die Annahme nahe, daß dieses Gen relativ stark konserviert ist. Mittels Southern-Hybridisierung sollte das Vorhandensein *CaVPS34*-homologer Sequenzen in verschiedenen Pilzstämmen untersucht werden. Dabei wurden die *Candida*-Spezies *C. tropicalis*, *C. krusei* (nach einer neueren Nomenklatur *Issatchenkia orientalis*), *C. pa-*

*rapsiosis*, *C. glabrata* und andere Hefen wie *Kluyveromyces lactis*, *S. cerevisiae*, *S. pombe* sowie die Hyphenpilze *Aspergillus fumigatus* und *Giberella fujikoroj* analysiert. Da das Vorhandensein von *VPS34*-Homologen in *S. cerevisiae* und *S. pombe* bekannt war, konnten diese beiden Stämme als Kontrolle herangezogen werden.

Alle in die Untersuchung einbezogenen Pilze gehören zur Abteilung der Ascomycota bzw. stellen die bei den Deuteromycota (Fungi imperfecti) eingeordneten anamorphen Formen der Endomycetes bzw. Ascomycetes dar. Die engste Verwandtschaft von *C. albicans* besteht zunächst zu den übrigen *Candida*-Spezies, wobei *C. glabrata*, welche teilweise als *Torulopsis glabrata* bezeichnet wird, eine gewisse Sonderstellung einnimmt. Als anamorphe Form wird *Candida* den Endomycetes gegenübergestellt, zu denen *S. cerevisiae*, *S. pombe* und *K. lactis* gehören. Verwandtschaftlich etwas weiter entfernt sind der zu den Ascomycetes gehörende *G. fujikoroj* sowie der als anamorphe Form der Ascomycetes zu den Hyphomycetes gehörende *A. fumigatus*.

Die Southern-Analyse wurde mit *EcoRI*/*HindIII*-geschnittener chromosomaler DNA der genannten Stämme einschließlich *C. albicans* durchgeführt. Die zur Hybridisierung des Southern-Blots bei geringer Stringenz verwendete geninterne Sonde (1,1 kb *Sall*/*SphI*-Fragment) umfaßte eine Region, deren abgeleitete Aminosäuresequenz (AS 525-891) in der C-terminalen Hälfte des Proteins lokalisiert ist. In diesem Bereich befinden sich hochkonservierte funktionelle Domänen (vgl. Abb. 1.5). Das Hybridisierungsmuster in Ab-



**Abb. 3.2: Southern-Analyse zur Identifizierung von *CaVPS34*-homologen Sequenzen in verschiedenen *Candida*-Spezies sowie weiteren Pilzstämmen.** Chromosomale DNA der einzelnen Stämme wurde mit *EcoRI*/*HindIII* geschnitten. Zur Hybridisierung unter Bedingungen niedriger Stringenz wurde das geninterne 1,1 kb *Sall*/*SphI*-Fragment von *CaVPS34* verwendet.

bildung 3.2 zeigt, daß in *C. tropicalis*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *K. lactis* Sequenzen nachgewiesen werden konnten, die zu *CaVPS34* homolog sind. Dabei wurde das stärkste Signal einer *CaVPS34*-homologen Sequenz in *C. tropicalis* gefunden. Das Hybridisierungssignal von *S. cerevisiae* diente als Kontrolle, da die Homologie von *ScVPS34* und *CaVPS34* bekannt ist. Allerdings ergab das ebenfalls bekannte *VPS34*-Homologe aus *S. pombe* kein entsprechendes Kreuzhybridisierungssignal. Dies kann durch die geringere Homologie zu *CaVPS34* sowie experimentell durch die gewählte Sonde wie auch durch die Hybridisierungsbedingungen bedingt sein. Das Fehlen von hybridisierenden Fragmenten in *A. fumigatus* und *G. fujikoroj* schließt die Existenz von *VPS34*-Homologen somit nicht aus, weist jedoch zumindest auf eine geringere Homologie hin. Ein zusätzliches Ergebnis dieser Untersuchung ist der Befund, daß die zur Kontrolle erfolgte Hybridisierung mit genomischer DNA von *C. albicans* SC5314 bei niedriger Stringenz keinen Hinweis auf die Existenz eines zu *CaVPS34* paralogen Gens in *C. albicans* erbrachte.

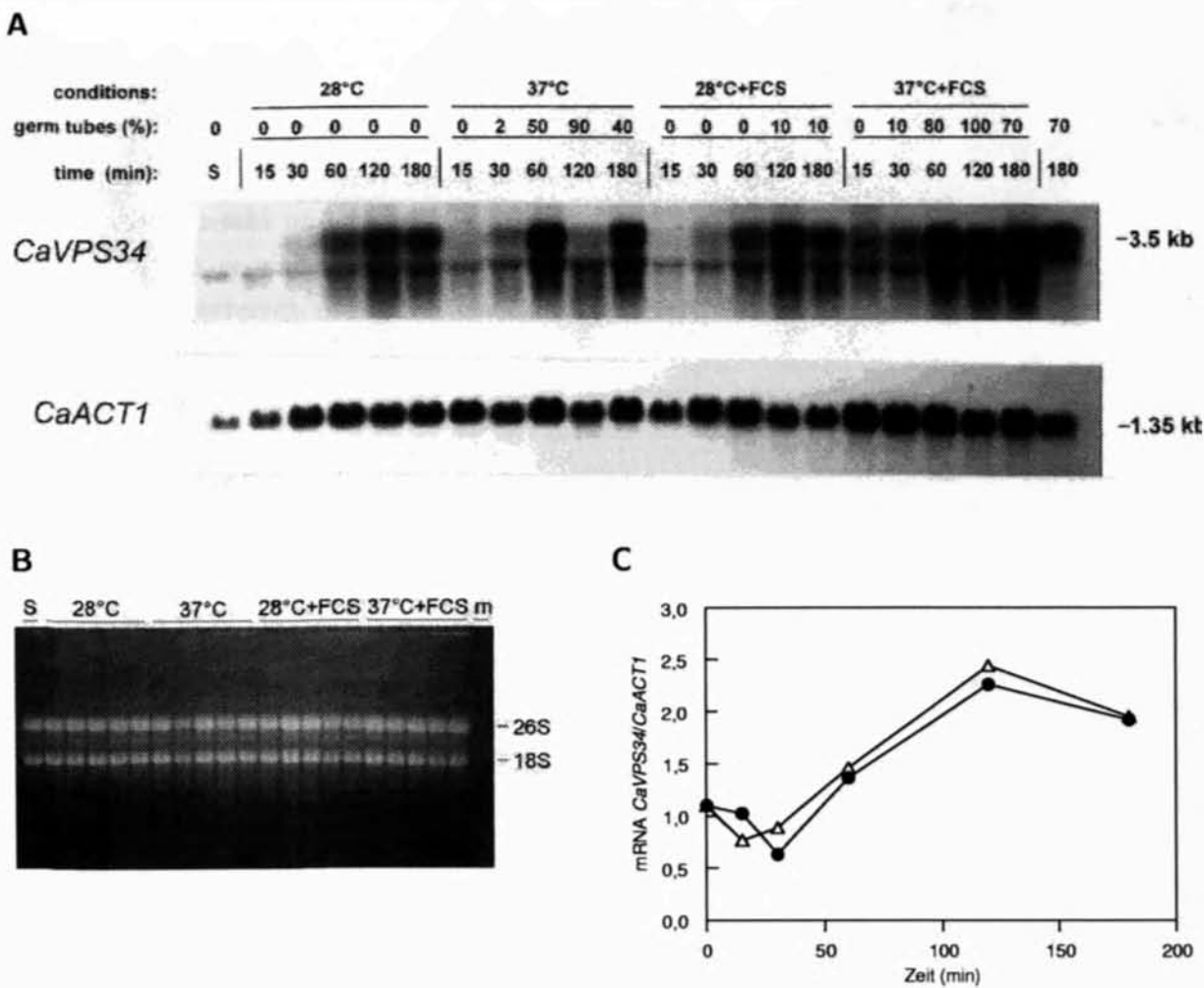
### **3.3 Analyse der Transkription von *CaVPS34* unter verschiedenen Wachstumsbedingungen**

Um bereits auf molekularer Ebene Hinweise auf die Funktion von *CaVPS34* in *C. albicans* zu gewinnen, wurde mittels Northern-Analyse die mRNA-Expression des Gens unter verschiedenen Wachstumsbedingungen untersucht. Die Fähigkeit des Übergangs vom Wachstum in der Hefeform zu hyphalem Wachstum ist ein wichtiges Virulenzcharakteristikum von *C. albicans*. Aus diesem Grund besteht allgemein ein großes Interesse daran, mit dem Dimorphismus im Zusammenhang stehende Gene zu identifizieren. Die differentielle Expression eines Gens während der Morphogenese kann als ein Hinweis auf eine mögliche Funktion dieses Gens bei morphogenetischen Veränderungen angesehen werden. So ist bekannt, daß einige Gene von *C. albicans*, wie z.B. die Familie der Aspartatproteasen (SAP's), in Abhängigkeit von morphogenetischen Veränderungen reguliert werden (Hube *et al.*, 1994). Andere phasenspezifisch exprimierte Gene, wie z.B. der Transkriptionsfaktor *EFG1*, regulieren wiederum ihrerseits den Ablauf der Morphogenese (Stoldt *et al.*, 1997). Da in der ebenfalls dimorphen Hefe *Y. lipolytica* der *SEC14*-abhängige Phosphoinositidmetabolismus eine wichtige Rolle bei der Hyphenmorphogenese spielt (Lopez *et al.*, 1994), könnte *VPS34* als Phosphatidylinositol3-Kinase in *C. albicans* möglicherweise eine Bedeutung für den Dimorphismus besitzen. Es war deshalb von besonderem Interesse festzustellen, ob *CaVPS34* während der Morphogenese von *C. albicans* differentiell exprimiert wird.

#### **3.3.1 Transkriptregulation von *CaVPS34* während der Morphogenese**

Für die Induktion von Hyphen in *C. albicans* sind verschiedene Induktorsubstanzen, wie z.B. Serum (FCS), N-acetylglucosamin oder Prolin, und andere Faktoren, wie z.B. Temperatur und pH-Wert, von Bedeutung (Odds, 1988). Eine sehr wirkungsvolle Metho-

de, Hyphen zu induzieren, besteht in der Zugabe von 10% FCS zum Medium und der Erhöhung der Temperatur auf 37°C. In der durchgeführten Analyse der *CaVPS34*-Expression während der Morphogenese wurden deshalb ebenfalls diese Bedingungen gewählt. Vergleichend dazu erfolgte die Untersuchung der *CaVPS34*-Expression beim Wachstum in der Hefeform. Dazu wurden Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 aus der späten exponentiellen Wachstumsphase in das entsprechende Induktions- bzw. Kontrollmedium inokuliert und entsprechend weiterinkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurde daraus Gesamt-RNA isoliert und im Northern-Blot analysiert. Die Zeitpunkte der Probenahme, die gewählten Wachstumsbedingungen und der Anteil gebildeter Hyphen sind



**Abb. 3.3: mRNA-Expression von *CaVPS34* und *CaACT1* in *C. albicans* SC5314 während der Hypheninduktion.** Zellen aus der späten logarithmischen Wachstumsphase wurden 1:10 verdünnt in YPD bzw. YPD+10% FCS überführt und bei 28°C bzw. 37°C inkubiert. Die Isolation von Gesamt-RNA die Bestimmung des Anteils an Hyphen erfolgte nach 0, 15, 30, 60, 120 und 180 min. A) Für die Northernanalyse wurden je 20 µg Gesamt-RNA eingesetzt und mit der 2,9 kb *BsmI*-Sonde von *CaVPS34* sowie der 1,5 kb *ClaI/SalI*-Sonde von *CaACT1* hybridisiert. Vergleichend erfolgte die Analyse einer mRNA-Probe (letzte Spur). B) Ethidiumbromidfärbung des RNA-Gels zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamt-RNA-Mengen. 18S und 26S RNA's sind als prominente Banden erkennbar. m: mRNA-Probe C) Vergleich der mRNA-Expression von *CaVPS34* beim Wachstum als Hefe bei 28°C (●) und bei der Hyphenmorphogenese bei 37°C/FCS (Δ). Dargestellt ist der Quotient der Transkriptabundanzen von *CaVPS34* und *CaACT1*.

in Abbildung 3.3 dargestellt. So erfolgte wie erwartet in YPD+10% FCS bei 37°C eine starke Hypheninduktion, während sie in YPD ohne FCS bei 37°C etwas schwächer verlief. Beim Wachstum in YPD+10% FCS bei 28°C kam es nur zu einer sehr geringfügigen Induktion von Hyphen, während in YPD bei 28°C nur Hefezellen gebildet wurden. Die Wahl der genannten Wachstumsbedingungen gestattete die Unterscheidung zwischen Hypheninduktionsbedingungen und dem möglichen Einfluß von FCS auf die Genexpression im Vergleich zu Normalbedingungen für hefiges Wachstum.

Für die Analyse der mRNA-Expression während der Morphogenese war es wichtig, von gleichen Mengen Gesamt-RNA auszugehen. Dies wurde einmal anhand der Intensität der rRNA im Northern-Gel überprüft (Abb. 3.3 B) und zusätzlich durch Hybridisierung mit der *CaACT1*-Sonde bestätigt. Der Einfluß der Induktionsbedingungen auf die Transkriptabundanz des *CaACT1*-Gens war bei dem gewählten Protokoll gering (Delbrück und Ernst, 1993), wodurch eine interne Kontrolle der eingesetzten RNA-Mengen möglich war.

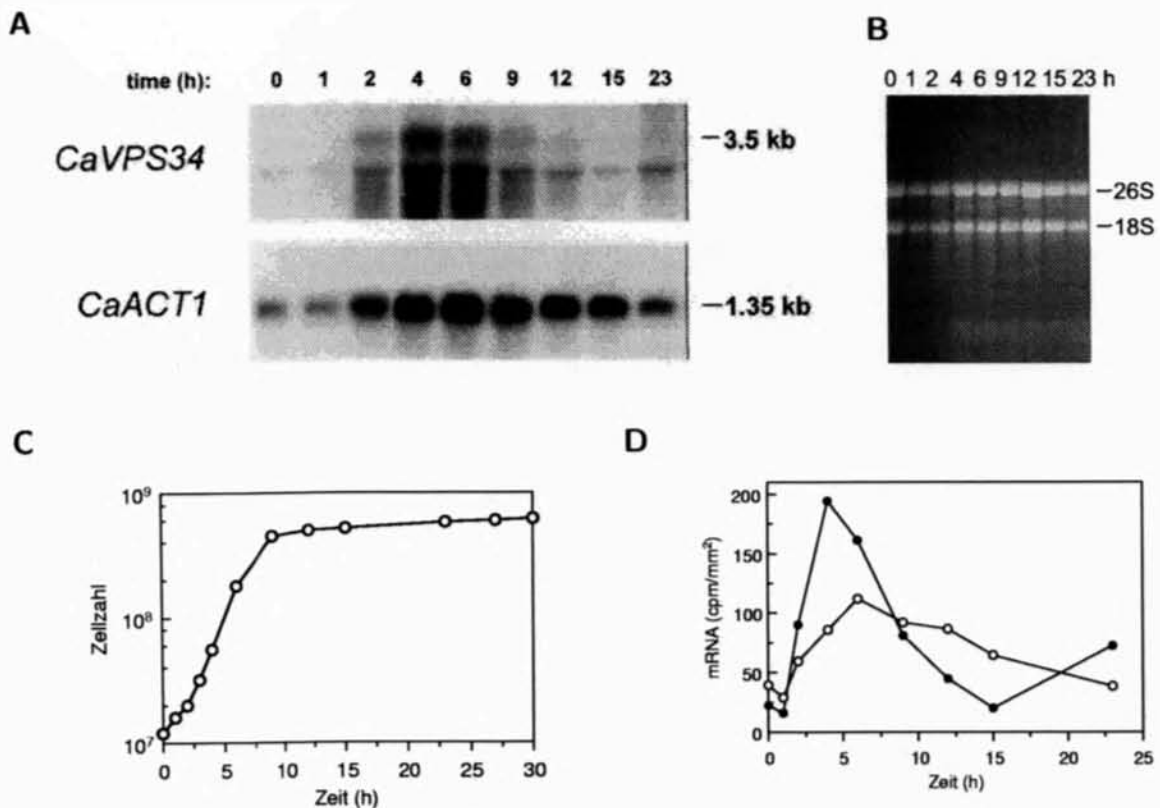
Die Northern-Analyse der *CaVPS34*-Expression brachte als ein wichtiges Ergebnis Aufschluß über Anzahl und Länge der gebildeten Transkripte sowie über die relative Transkriptabundanz gegenüber dem stark exprimierten *CaACT1*-Gen (Abb. 3.3 A). So konnte unter den getesteten Bedingungen ein prominentes *CaVPS34*-Transkript von 3,5 kb detektiert werden. Die Größe dieser mRNA kann mit der Länge der *CaVPS34* kodierenden Sequenz (3,1 kb) zuzüglich 3'- und 5'-untranslatierter Regionen sowie dem poly(A)-Schwanz gut in Übereinstimmung gebracht werden. In Abbildung 3.3 A findet man eine zweite etwa 3,3 kb große Bande. Um die Herkunft dieses zweiten putativen *CaVPS34*-Transkriptes zu untersuchen, wurde von einer Gesamt-RNA-Präparation die mRNA isoliert und im Northernblot analysiert (Abb. 3.3 A, letzte Spur). Dabei wurde die 3,5 kb große mRNA als prominentestes Transkript bestätigt. Ein 3,3 kb-Transkript wurde dagegen nicht gefunden, wohl aber ein schwächeres Transkript von 3,4 kb. Das bedeutet, daß es tatsächlich ein schwächeres zweites *CaVPS34*-Transkript gibt. Durch die große Menge der in derselben Höhe laufenden 26S rRNA in den Gesamt-RNA-Präparationen kommt es jedoch zu einer Abweichung im Laufverhalten dieses Transkriptes, dem sogenannten "Trapping" (Bormann *et al.*, 1997), ein Effekt, der durch das insgesamt sehr geringe Expressionsniveau von *CaVPS34* besonders stark ins Gewicht fällt. So wurde wahrscheinlich ein Teil der *CaVPS34* mRNA durch die bei 3,4-3,5 kb laufende und in großer Menge vorhandene 26S rRNA abgetrennt und im Gel vor der 26S rRNA hergeschoben. Dafür spricht auch die Tatsache, daß das 3,3 kb-Transkript als dünne scharf fokussierte Bande hybridisiert, während das 3,5 kb-Transkript ein breiteres und unschärferes Signal ergibt. *CaVPS34* zeigt im Vergleich zu *CaACT1* eine wesentlich schwächere mRNA-Expression. Bei etwa gleichstarker radioaktiver Markierung der beiden Sonden mußte der Northernblot nach der zuerst erfolgten Hybridisierung mit *CaVPS34* mindestens sieben Tage auf einem Röntgenfilm exponiert werden, während für die Detektion der *CaACT1*-Signale ein Tag ausreichend war.

Die Analyse der Regulation der *CaVPS34*-Expression zeigt, daß es unter allen gewählten Bedingungen zu einer Erhöhung der Transkriptabundanz von *CaVPS34* kommt (Abb.

3.3 A). Dabei wird vor allem deutlich, daß sowohl bei reinem Hefewachstum (28°C) als auch bei einer starken Hyphenbildung (37°C+FCS) ein vergleichbares Regulationsmuster bei der mRNA-Expression von *CaVPS34* mit einer maximalen Verstärkung der Expression nach 120 min festgestellt werden kann (Abb. 3.3 A). Dies bestätigt sich nochmals bei der quantitativen Auswertung, wobei eine Normalisierung der Werte für die Transkriptabundanz von *CaVPS34* durch Quotientbildung mit der Transkriptabundanz von *CaACT1* vorgenommen wurde (Abb. 3.3 C). Daraus ergibt sich, daß die Expression von *CaVPS34* mit zunehmendem Wachstum induziert wird und unabhängig von der Wachstumsform erfolgt. Die durchgeführte Northern-Analyse verdeutlicht somit, daß es sich nicht um eine morphogeneseabhängige, sondern eher um eine wachstumsabhängige Regulation handelt.

### 3.3.2 Wachstumsabhängige Regulation der *CaVPS34*-Transkription

Zur Bestätigung der Wachstumsabhängigkeit der *CaVPS34*-Expression wurde eine Northern-Analyse im Verlauf des Wachstums von *C. albicans* durchgeführt (Abb. 3.4). Die



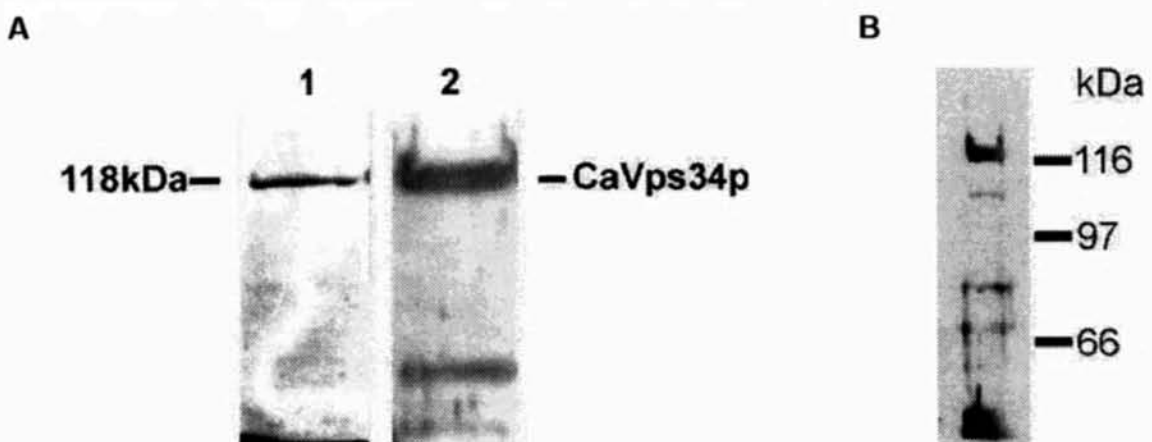
**Abb. 3.4: mRNA-Expression von *CaVPS34* und *CaACT1* in *C. albicans* SC5314 im Verlauf des Wachstums in der Hefeform.** YPD-Medium wurde mit  $1 \times 10^7$  Zellen/ml aus der späten logarithmischen Wachstumsphase angeimpft und bei 28°C inkubiert. Nach 0, 1, 2, 4, 6, 9, 12, 15 und 23 h erfolgte die Probenahme zur RNA-Isolation und die Bestimmung der Zellzahl. A) Die Northern-Analyse wurde mit 10 µg Gesamt-RNA unter Verwendung der 2,9 kb *BsmI*-Sonde von *CaVPS34* sowie der 1,5 kb *ClaI/SalI*-Sonde von *CaACT1* durchgeführt. B) Ethidiumbromidfärbung des RNA-Gels zur Kontrolle der aufgetragenen Gesamt-RNA-Mengen. C) Wachstumsverlauf der untersuchten *C. albicans*-Kultur. D) Regulation der Expression von *CaVPS34* (●) und *CaACT1* (○). Die Auswertung erfolgte nach einer Expositionszeit von 2 h (*CaACT1*) bzw. 16 h (*CaVPS34*).



Zeitpunkte der Probenahme zur RNA-Isolierung sowie den Verlauf der Wachstumskurve dokumentiert Abbildung 3.4 A, C. Es wurden wiederum zwei Transkripte im Northernblot detektiert, wobei die Regulation beider Transkripte kohärent verlief (Abb. 3.4 A). Wie Abbildung 3.4 außerdem zeigt, nahm die Transkriptabundanz von *CaVPS34* etwa bis zur Mitte der logarithmischen Wachstumsphase deutlich zu und fiel danach wieder ab. Dabei wurde eine maximale Erhöhung der Transkriptabundanz auf das 12-fache des Ausgangswertes erreicht (Abb. 3.4 D). Demnach ist die transiente Induktion der *CaVPS34*-Expression an das exponentielle Wachstum von *C. albicans* gebunden. Die zum Vergleich analysierte *CaACT1* mRNA-Expression zeigte ebenfalls einen wachstumsabhängigen Verlauf (Abb. 3.4 A, C). Dabei wurde das Maximum der *CaACT1*-Expression jedoch etwas später als bei *CaVPS34* erreicht, und die relative Erhöhung der Transkriptabundanz war weniger stark. Ein solcher Verlauf ist typisch für das Wachstum von *C. albicans* in der Hefeform (Delbrück und Ernst, 1993). Somit wurde durch die detaillierte Analyse der *CaVPS34*-Expression während des Wachstums von *C. albicans* bestätigt, daß *CaVPS34* einer wachstumsabhängigen Regulation unterliegt.

### 3.4 Heterologe Expression von CaVps34p in *E. coli*

Um CaVps34p unter *in vitro*-Bedingungen biochemisch charakterisieren zu können sowie für die Herstellung polyklonaler anti-CaVps34p-Antikörper mußte das Protein zunächst in ausreichender Menge gewonnen werden. Eine Möglichkeit bestand darin, CaVps34p als Fusionsprotein heterolog in *E. coli* zu exprimieren und mit Hilfe des fusionierten HisTags aufzureinigen. Dazu wurde ein kommerziell erhältliches Expressionssystem (pQE-System) verwendet, wobei die kodierende Sequenz von *CaVPS34* hinter den HisTag des Expressionsvektors pQE9 kloniert wurde. Mit Hilfe der Primer PQ1 und PQ2 (siehe 2.2.1) wurde die kodierende Sequenz von *CaVPS34* mit Ausnahme des Startcodons in einer PCR



**Abb. 3.5: Western-Analyse des rekombinanten CaVps34p aus *E. coli*.** A) Coomassie-Färbung des gereinigten hisTag-Fusionsproteins (1). Nachweis des gewonnenen HisTag-CaVps34p durch Western-Analyse mit Hilfe eines anti-HisTag-Antikörpers (2). B) Detektion des Fusionsproteins mittels eines anti-CaVps34p-Antiserums.

amplifiziert und über die von den Primern gelieferten Restriktionsorte (*Bam*HI, *Pst*I) im richtigen Leserahmen in den Vektor pQE9 kloniert. Nach der Identifizierung positiver Klone und ihrer Überprüfung durch Sequenzierung des N-terminalen Bereiches unter Verwendung des Standardprimers pQEIII/IV (vgl. 2.2.1) wurde das entstandene Konstrukt pVPEX1 in den *E. coli*-Stamm M15 [pREP4] transformiert. Bei den anschließenden Versuchen zur Expression von *CaVPS34* zeigte sich, daß zwar HisTag-Protein nachgewiesen werden konnte, die Expressionsstärke dabei jedoch sehr gering war. Nachdem auch durch Variation der Kultur- und Induktionsbedingungen wie Temperatur, Medium, Kinetik bzw. durch die Verwendung eines anderen *E. coli*-Stammes die Effizienz der Expression nicht erhöht werden konnte, ergab sich die Notwendigkeit, das Volumen und damit die Biomasse des präparativen Ansatzes noch weiter zu erhöhen. Die Kultivierung und Induktion erfolgte deshalb in einem Fermenter. Bei der anschließenden Aufreinigung mußte dementsprechend in größerem Maßstab gearbeitet werden. Die dabei gewonnene Menge gereinigten HisTag-Fusionsproteins erlaubte schließlich die Durchführung von umfangreicheren *in vitro*-Tests zur Enzymaktivität sowie die Herstellung eines polyklonalen Antiserums gegen *CaVps34p*. Abbildung 3.5 A zeigt das rekombinante *CaVps34p* nach Coomassie-Färbung sowie nach Detektion mittels eines anti-HisTag-Antikörpers. Dabei entsprach das Molekulargewicht des rekombinanten Fusionsproteins dem berechneten Wert von 118 kDa. Das aus Kaninchen gewonnene anti-*CaVps34p*-Antiserum (Eurogentec) wurde ebenfalls zur Detektion des gereinigten HisTag-Proteins im Westernblot verwendet (Abb. 3.5 B). Mit Hilfe dieses Antiserums konnte *CaVps34p* parallel zur HisTag-Detektion nachgewiesen werden. Allerdings war die spezifische Bindung der anti-*CaVps34p*-Antikörper an *CaVps34p* nur gering, so daß mit diesem Antiserum keine weiteren Untersuchungen, wie der immunochemische Nachweis des Proteins in Rohextrakten von *C. albicans* bzw. eine Immunpräzipitation von *CaVps34p*, möglich waren.

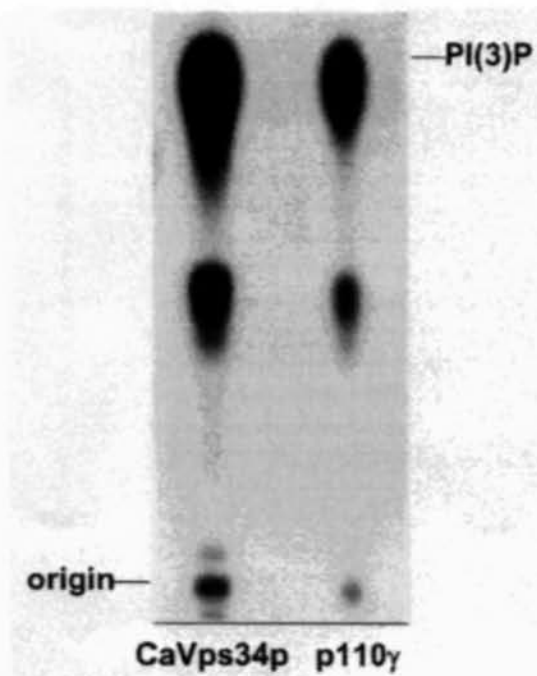
### 3.5 Enzymaktivitäten des rekombinanten Proteins

Sequenzvergleiche zeigen, daß *CaVPS34* auf Aminosäureebene 47% Identität zu *VPS34* aus *S. cerevisiae* besitzt. In seiner C-terminalen Region beträgt die Homologie des *C. albicans*-Proteins zu *ScVps34p* sogar 65%. Die Sequenzhomologie zu anderen PI3-Kinasen ist in dieser Region ebenfalls hoch. Da in der Nähe des C-Terminus die katalytische Domäne lokalisiert ist, die für die Lipidkinaseaktivität verantwortlich ist und in einigen bekannten PI-kinasen ebenfalls eine intrinsische Proteinkinaseaktivität aufweist, wurden mit dem in *E. coli* exprimierten *CaVps34p* *in vitro*-Untersuchungen zur Lipidkinaseaktivität, Substratspezifität sowie Autophosphorylierung durchgeführt.

#### 3.5.1 Lipidkinaseaktivität von *CaVps34p*

Um nachzuweisen, daß *CaVps34p* eine funktionelle PI3-Kinase ist, wurde das gereinigte HisTag-Fusionsprotein in einem PI3-Kinase-Assay eingesetzt. Zur Gewinnung eines

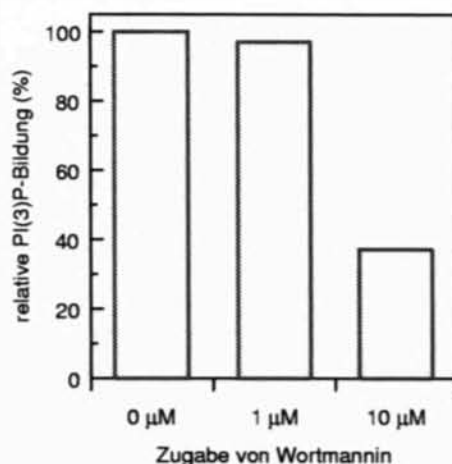




**Abb. 3.6: *In vitro*-Lipidkinaseaktivität von rekombinantem CaVps34p.** CaVps34p phosphoryliert PI zu PI(3)P. Als Kontrolle wurde die humane PI3-Kinase p110  $\gamma$  verwendet. Die Auftrennung der Lipidspezies erfolgte mittels Dünnschichtchromatografie (DC) in einem Boratpuffersystem.

PI(3)P-Standards wurde die PI3-Kinase p110 $\gamma$  aus Humanzellen im Assay mitgeführt. Durch den Nachweis von 3'-phosphoryliertem PI (Abb. 3.6) konnte gezeigt werden, daß rekombinantes CaVps34p *in vitro*-PI3-Kinase-Aktivität besitzt. Somit wurde nachgewiesen, daß VPS34 aus *C. albicans* eine funktionelle Phosphatidylinositol3-Kinase ist. Neben dem PI(3)P-Spot ist in Abbildung 3.6 noch ein weiteres Signal sichtbar. Dieser zusätzliche Spot repräsentiert Lysophosphatidylinositol3-phosphat, wahrscheinlich als Folge einer Verunreinigung des Substrates Phosphatidylinositol (PI) mit Lysophosphatidylinositol (*lyso*-PI). *Lyso*-PI besitzt eine unveresterte sekundäre Hydroxylgruppe und entsteht unter physiologischen Bedingungen aus PI durch Einwirkung der Phospholipase A.

PI3-Kinasen aus Humanzellen werden effektiv durch den Naturstoff Wortmannin gehemmt. Wortmannin reagiert dabei kovalent mit der ATP-Bindestelle in der Nähe der Substratbindestelle der Proteine. Die Wirkung des Inhibitors beruht auf der irreversiblen Bindung an die Aminosäure Lysin durch Ausbildung einer Schiff'schen Base. Diese Aminosäure ist innerhalb der PI3-Kinase-Familie, in PI3-Kinase verwandten Proteinen sowie einigen Proteinkinasen konserviert (Wymann *et al.*, 1996). Die Sensitivität der PI3-Kinase Vps34p aus *S. cerevisiae* gegenüber Wortmannin ist relativ gering. So wird diese erst bei Zugabe mikromolarer Dosen des Inhibitors gehemmt (Stack *et al.*, 1994). Um die Wirkung von Wortmannin auf CaVps34p zu testen, wurde den Versuchsansätzen vor dem Start der Reaktion 1  $\mu$ M bzw. 10  $\mu$ M des Inhibitors zugegeben und diese dann 10 min bei 4°C vorinkubiert. Anschließend wurde der PI3-Kinase-Assay wie oben beschrieben durchgeführt. Bei Zugabe von 1  $\mu$ M Wortmannin wurde keine Hemmwirkung festgestellt, während 10  $\mu$ M zu einer Verringerung des PI(3)P-Levels auf etwa 40% führten (Abb. 3.7).

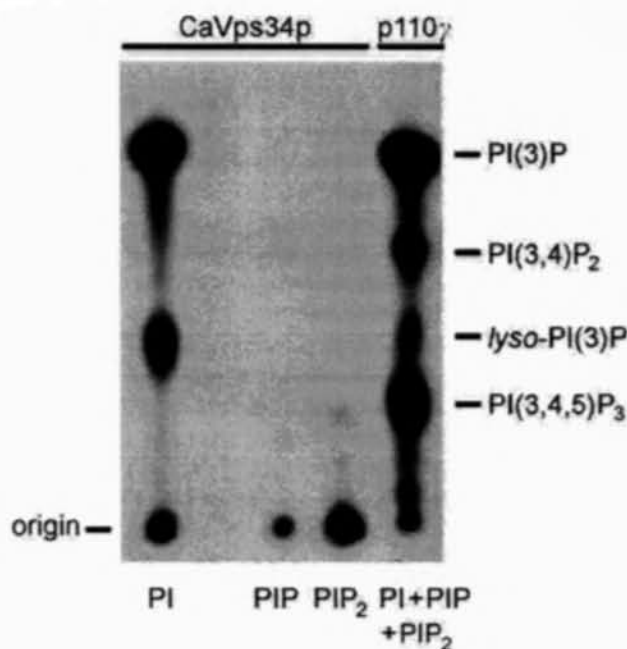


**Abb. 3.7: Einfluß von Wortmannin auf die *in vitro*-PI3-Kinase-Aktivität von CaVps34p.** Rekombinantes CaVps34p wurde 10 min mit 1  $\mu\text{M}$  bzw. 10  $\mu\text{M}$  Wortmannin vorinkubiert und anschließend im PI3-Kinase-Assay untersucht. Nach der Dünnschichtchromatografie wurde das gebildete PI(3)P mit Hilfe eines Phosphoimagers quantifiziert.

Es zeigte sich somit, daß CaVps34p ähnlich wie ScVps34p relativ insensitive gegenüber Wortmannin ist.

### 3.5.2 Substratspezifität von CaVps34p

PI3-Kinasen werden aufgrund ihrer Substratspezifität in drei verschiedene Klassen eingeteilt (Vanhaesebroeck *et al.*, 1997). Für Vps34p aus *S. cerevisiae* wurde gezeigt, daß diese



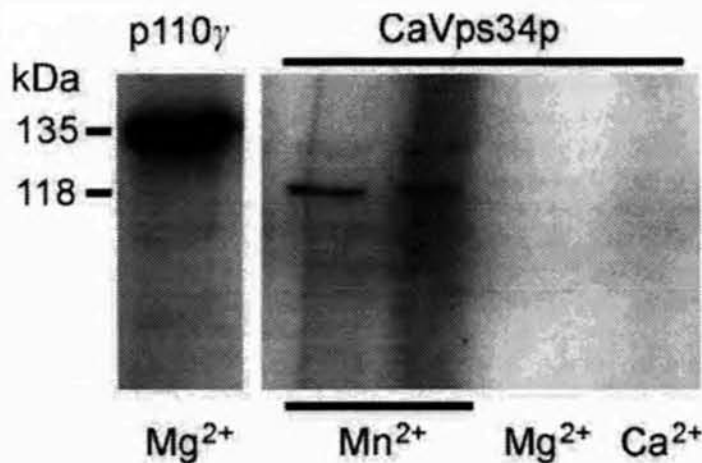
**Abb. 3.8: *In vitro*-Substratspezifität von rekombinantem CaVps34p.** Es wurde die Verwendung von PI, PI(4)P und PI(4,5)P<sub>2</sub> als Substrat für die 3'-Phosphorylierung durch CaVps34p untersucht. CaVps34p phosphoryliert ausschließlich Phosphatidylinositol (PI). Die Unterscheidung der Lipidspezies erfolgte dünnschichtchromatografisch in einem H<sub>2</sub>O-C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>O<sub>2</sub>-C<sub>3</sub>H<sub>6</sub>O-CHCl<sub>3</sub>-Puffersystem. Humanes p110 $\gamma$  phosphoryliert alle drei Substrate und wurde deshalb als Standard mitgeführt.

PI3-Kinase ausschließlich Phosphatidylinositol (PI) in 3'-Position am Inositolring phosphoryliert (Stack und Emr, 1994). ScVps34p begründete deshalb die PI-spezifische Klasse III der PI3-Kinasen. Homologe Proteine aus anderen Organismen, wie z. B. Vps34p aus Humanzellen, phosphorylieren unter *in vitro*-Bedingungen ebenfalls ausschließlich PI (Volinia *et al.*, 1995). Eine Restriktion der Substratspezifität auf PI wurde deshalb auch für das aus *C. albicans* klonierte VPS34-Homologe erwartet. Um dies zu überprüfen, wurden im PI3-Kinase-Assay neben PI auch die durch PI3-Kinasen der Klassen I und II phosphorylierten Substrate Phosphatidylinositol(4)phosphat (PI(4)P) und Phosphatidylinositol(4,5)bisphosphat (PI(4,5)P<sub>2</sub>) angeboten. Dabei diente die PI3-Kinase  $\gamma$  aus Humanzellen wiederum als Standard, da von diesem Enzym alle drei Substrate 3'-phosphoryliert werden (Stoyanov *et al.*, 1995). Aus Abbildung 3.8 wird deutlich, daß CaVps34p wie erwartet ausschließlich die Umwandlung von PI in PI(3)P katalysiert.

### 3.5.3 Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p

Experimentelle Hinweise belegen, daß Vps34p aus *S. cerevisiae* eine multispezifische Kinase mit Lipid- und Proteinkinaseaktivität ist (Stack *et al.*, 1994). Andere Vps34p-Homologe, wie z.B. humanes Vps34p, besitzen diese Autophosphorylierungsaktivität nicht (Volinia *et al.*, 1995). Es stellte sich deshalb die Frage, ob *C. albicans* Vps34p in der Lage ist, sich selbst zu phosphorylieren.

Der Autophosphorylierungstest mit dem rekombinanten Protein zeigte, daß CaVps34p unter *in vitro*-Bedingungen neben seiner Lipidkinaseaktivität außerdem eine intrinsische Autophosphorylierungsaktivität besitzt (Abb. 3.9). Allerdings konnte zunächst nicht ganz ausgeschlossen werden, daß die verwendete Proteinpräparation von CaVps34p Kontaminationen durch andere Proteine (möglicherweise mit Proteinkinaseaktivität) enthielt. Mit einer Proteinprobe aus einer weiter verbesserten Aufreinigung des rekombinanten Prote-



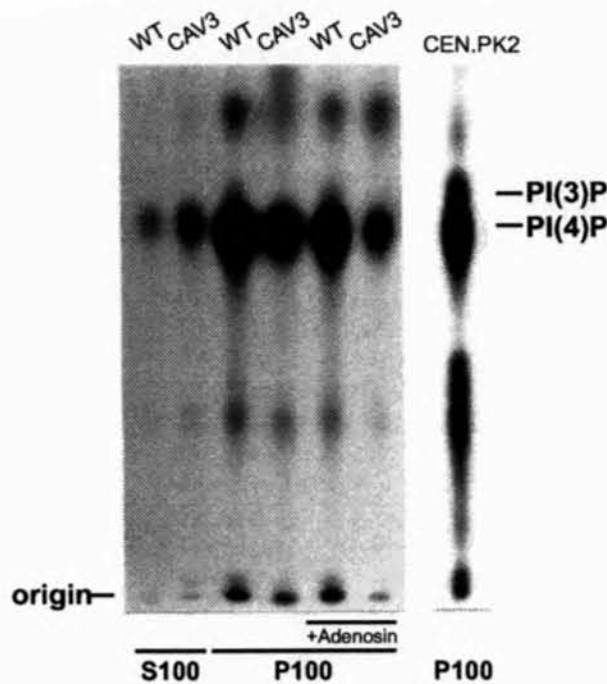
**Abb. 3.9: *In vitro*-Autophosphorylierung von rekombinantem CaVps34p.** Die Phosphorylierung von CaVps34p wurde in einer *in vitro*-Proteinkinase-Reaktion unter Zugabe von [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP und jeweils 10 mM MnCl<sub>2</sub>, MgCl<sub>2</sub> bzw. CaCl<sub>2</sub> untersucht. Als Kontrolle diente die humane PI3-Kinase p110 $\gamma$ . Die radioaktiv markierten Proteine wurden durch SDS-PAGE und Autoradiografie detektiert. In der rechten MnCl<sub>2</sub>-Spur wurde eine Probe ohne Glycerin verwendet.

ins konnte die *in vitro*-Autophosphorylierungsaktivität von CaVps34p jedoch verifiziert werden (nicht abgebildet).

Die Autophosphorylierung von CaVps34p wurde in Gegenwart verschiedener zweiwertiger Kationen untersucht. Im Vergleich von  $Mn^{2+}$ ,  $Mg^{2+}$  und  $Ca^{2+}$  konnte bei Zugabe von  $Mn^{2+}$  das deutlichste Phosphorylierungssignal detektiert werden (Abb. 3.9). Mit  $Mg^{2+}$  war nur ein sehr schwaches Signal erkennbar, während bei  $Ca^{2+}$  keine Autophosphorylierung von CaVps34p festgestellt werden konnte. Dies weist auf eine Präferenz der Proteinkinaseaktivität von CaVps34p gegenüber  $Mn^{2+}$  als Kofaktor hin.

### 3.5.4 PI3-Kinase-Aktivität in Proteinextrakten von *C. albicans*

In Abschnitt 3.5.1 wurde gezeigt, daß rekombinantes CaVps34p PI3-Kinase-Aktivität besitzt. Von großem Interesse war jedoch auch, diese Lipidkinaseaktivität direkt in Proteinextrakten von *C. albicans* nachzuweisen. Dazu wurden Proteinrohextrakte des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 hergestellt. Da aus den Northern-Experimenten (vgl. 3.3) bekannt war, daß die Expression von *CaVPS34* wachstumsreguliert ist und während der mittleren exponentiellen Phase ein Maximum erreicht, wurden die Zellen zur Proteinextraktgewinnung dementsprechend entnommen. Die Rohextrakte wurden in cytosolische



**Abb. 3.10: Lipidkinaseaktivität in Proteinextrakten von *C. albicans*.** Cytosolische Fraktion (S100) und Membranfraktion (P100) aus Proteinextrakten von *C. albicans* SC5314 sowie des *CaVPS34*-defizienten Stammes CAV3 (vgl. 3.7) wurden im *in vitro*-PI3-Kinase-Assay unter Zugabe von PI als Substrat untersucht. SC5314 zeigte in der Membranfraktion neben dem hohen PI(4)P-Anteil einen schwachen PI(3)P-Signal. Im Cytosol von SC5314 sowie in beiden Fraktionen des Stammes CAV3 war lediglich PI(4)P nachweisbar. Durch Zugabe von 50  $\mu M$  Adenosin erfolgte keine Erhöhung des PI(3)P-Levels. Die PI(3)P- und PI(4)P-Standards wurden durch Mitführen der Membranfraktion des *S. cerevisiae*-Stammes CEN.PK2 gewonnen. Die dünnschichtchromatografische Auftrennung erfolgte im Boratpuffersystem.

und membranöse Fraktionen aufgetrennt, um die Hauptaktivität des Proteins lokalisieren zu können. Als Kontrolle wurde die Membranfraktion eines *S. cerevisiae*-Stammes auf gleiche Weise analysiert.

Hefezellen besitzen eine Reihe verschiedener PI-Kinasen. Neben der PI3-Kinase Vps34p existieren z.B. auch PI4-Kinasen, welche PI in 4'-Position phosphorylieren. Es war demzufolge notwendig, bei der dünnsschichtchromatografischen Auftrennung eine genaue Unterscheidung von PI(3)P und PI(4)P zu treffen. Dazu eignet sich das Boratpuffersystem (Walsh *et al.*, 1991). Die Methode beruht auf der Bildung von Boratkomplexen mit *cis*-Diolen des Inositolrings. Bei PI(3)P ist das *cis*-Diol durch den Phosphomonoester geblockt, so daß kein Boratkomplex gebildet werden kann. PI(4)P hat dagegen ein 2,3 *cis*-Diol und kann mit Borsäure komplexieren. Die Trennung der Inositolisomere wird durch ein geeignetes Laufmittelsystem ermöglicht, wobei PI(3)P oberhalb von PI(4)P läuft.

Aus Abbildung 3.10 geht hervor, daß der Hauptanteil des Phosphatidylinositols in 4'-Position phosphoryliert ist, während PI(3)P nur in der Membranfraktion des Wildtypstammes SC5314 und auch dort nur in Spuren nachweisbar ist. Im Vergleich zu *C. albicans* ist die Menge des in *S. cerevisiae* nachgewiesenen PI(3)P deutlich größer. Daraus ergibt sich ein weiterer Hinweis darauf, daß CaVps34p ein sehr seltenes Protein ist. Den ersten dementsprechenden Hinweis hatten Northern-Analysen geliefert, bei denen eine relativ geringe Transkriptabundanz von *CaVPS34* festgestellt worden war (vgl. 3.3.1). CaVps34p könnte außerdem auch auf Proteinebene eine geringe Halbwertszeit aufweisen. Eine weitere mögliche Ursache der geringen Menge PI(3)P könnte zudem sein, daß dieses selbst einem raschen Turnover z.B. als Substrat für weitere Phosphorylierungen oder Dephosphorylierungen unterliegt. Eine Kompetition von CaVps34p mit PI4-Kinasen ist eher unwahrscheinlich, da alle Reaktionskomponenten im Überschuß eingesetzt wurden. Durch die Zugabe von 50  $\mu$ M Adenosin, einem Inhibitor von PI4-Kinasen, wurde dennoch versucht, die PI4-Kinase-Aktivität zu verringern. Eine Verstärkung des PI(3)P-Signals konnte auf diese Weise jedoch nicht erreicht werden (Abb. 3.10). Darüberhinaus wurde durch Zugabe von Detergentien versucht, membranassoziierte Proteine von der Membranfraktion abzulösen. Dabei wurde aber ebenfalls keine erhöhte PI(3)P-Bildung nachgewiesen (nicht dargestellt).

## **3.6 Komplementationsversuche mit *S. cerevisiae* vps34- und vps15-Mutanten**

### **3.6.1 Versuch der Komplementation einer *S. cerevisiae* vps34-Mutante durch *CaVPS34* unter der Kontrolle seines eigenen Promotors**

Eine Möglichkeit der funktionellen Charakterisierung von CaVps34p bestand darin zu überprüfen, ob der Wachstumsdefekt einer *S. cerevisiae* vps34-Deletionsmutante durch *CaVPS34* komplementiert werden kann. Dazu wurde zunächst das Plasmid YCpAB2 konstruiert. Dieses Plasmid enthält *CaVPS34* auf einem 4,9 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment,

welches in den *URA3*-markierten *E. coli-S. cerevisiae* Shuttle-Vektor YCp50p eingebaut worden war. Damit sollte gewährleistet werden, daß die Expression von *CaVPS34* durch seinen eigenen Promotor reguliert wird. Aufgrund des in YCp50p enthaltenen *CEN*-Elementes beträgt die Kopiezahl des Plasmids in *S. cerevisiae* nur eins bis zwei, zeigt dabei aber mit einer Verlustrate von unter 1% pro Zelle und Generation eine hohe mitotische Stabilität (Rose *et al.*, 1987).

Für den Komplementationstest wurde der *S. cerevisiae vps34*-Mutantenstamm PHY102 mit YCpAB2 [*CaVPS34*] transformiert, auf YNB-Agar (leu, lys, trp) ausplattiert und bei 30°C inkubiert. Zusätzlich dazu erfolgte die Transformation von PHY102 mit dem Ausgangsplasmid YCp50p. Nach fünf Tagen Wachstum wurden uridinprototrophe Klone selektiert und je acht dieser Klone anschließend im Komplementationstest untersucht. Die Transformanten wurden dazu in Sektoren auf YNB-Platten (leu, lys, trp, his, ura) ausgestrichen und parallel bei 30°C und 37°C inkubiert. Außerdem wurden der untransformierte Mutantenstamm PHY102 sowie der *S. cerevisiae*-Stamm CEN.PK2 als Kontrollen mitgeführt. CEN.PK2 wurde als Wildtypstamm eingesetzt, da der eigentliche Mutterstamm SEY6210 nicht zur Verfügung stand. Die Auswertung des Komplementationsversuches erfolgte nach fünf bis sieben Tagen. Dabei war das Wachstum der verglichenen Stämme bei 30°C (permissive Temperatur) wie erwartet normal. Bei der nicht-permissiven Temperatur von 37°C war entgegen den Erwartungen keine Verbesserung des Wachstums der *CaVPS34* enthaltenden Transformanten im Vergleich zu PHY102 erkennbar (Tab. 3.2). Durch das anschließende Plasmid-Rescue-Experiment mit sechs Transformanten konnte jedoch gezeigt werden, daß das Restriktionsmuster der aus den Transformanten zurückgewonnenen Plasmide mit dem des ursprünglich transformierten Plasmides YCpAB2 übereinstimmt. Von 24 analysierten Plasmiden wies lediglich eines eine Deletion auf. Die *CaVPS34*-kodierende Sequenz von zwei durch "Rescue" erhaltenen Plasmiden wurde außerdem kontrollsequenziert (Primer PK1-PK16, vgl. 2.2.1), wobei jedoch keine Mutation festgestellt werden konnte.

Zusammenfassend wird deutlich, daß *CaVPS34* unter seinem eigenen Promotor nicht in der Lage ist, eine *S. cerevisiae vps34*-Mutante zu komplementieren.

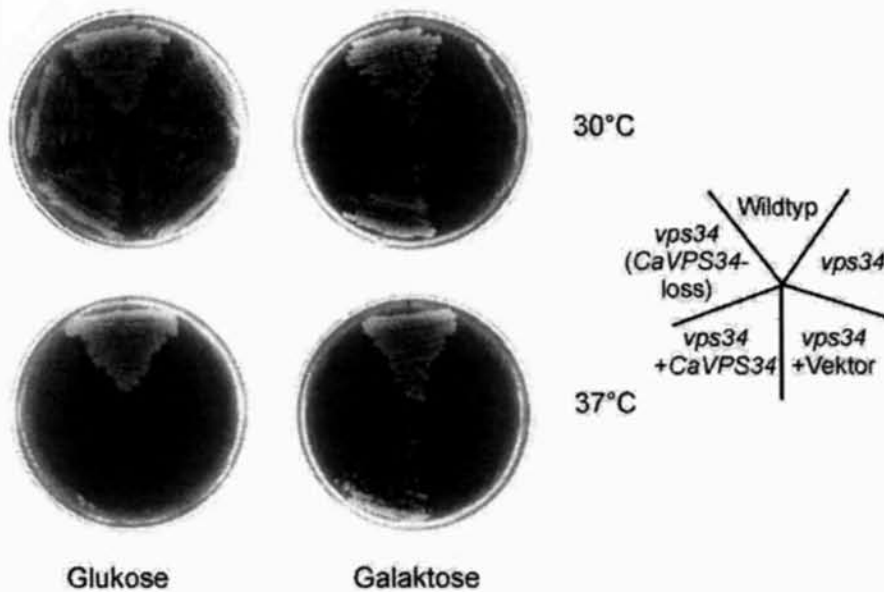
Stamm	Wachstum	
	28°C	37°C
CEN.PK2 ( <i>VPS34</i> )	+	+
PHY102 ( <i>vps34</i> )	+	–
PHY102 ( <i>vps34</i> + YCp50p)	+	–
PHY102 ( <i>vps34</i> + YCpAB2 ( <i>CaVPS34</i> ))	+	–

**Tab. 3.2: Komplementationsversuch von *S. cerevisiae vps34* mit *CaVPS34*.** *CaVPS34* ist nicht in der Lage, durch eine Expression unter der Kontrolle seines eigenen Promotors den temperaturabhängigen Wachstumsdefekt von *S. cerevisiae vps34* aufzuheben.



### 3.6.2 Komplementation einer *S. cerevisiae* *vps34*-Mutante durch Überexpression von *CaVPS34*

Die durch *CaVPS34* mit eigenem Promotor nicht erreichte Komplementation der *S. cerevisiae* *vps34*-Mutante initiierte einen weiteren Komplementationsversuch, bei dem zur Expression von *CaVPS34* ein "high-copy"-Vektor sowie der regulierbare *S. cerevisiae* *GAL1*-Promotor verwendet wurden. Zu diesem Zweck wurde das Plasmid pYGAB1 genutzt, welches ursprünglich zur Gewinnung rekombinanten Proteins aus *S. cerevisiae* generiert worden war. In pYGAB1 ist die codierende Sequenz von *CaVPS34* abzüglich des Startcodons als 3,1 kb *Bam*HI/*Eco*RI-Fragment hinter das Gen für die Glutathion S-Transferase (*GST*) kloniert. *CaVPS34* befindet sich damit ebenfalls hinter dem *GAL1*-Promotor des Ausgangsplasmides pYES2G. Das verwendete Plasmid ist ein 2 $\mu$ -Vektor, welcher in hoher Kopiezahl in der Zelle vorliegt. Es ist von dem *S. cerevisiae*-Proteinexpressionsvektor pYES2 (Invitrogen) abgeleitet. Im Unterschied zu pYES2 enthält das von C. Bergmann zur Verfügung gestellte Plasmid pYES2G zusätzlich die *GST*-Sequenz zur Erzeugung N-terminaler Fusionen der zu exprimierenden Proteine mit dem GST-Tag. Bei der Wahl des Plasmides pYGAB1 für die Komplementationstests wurde davon ausgegangen, daß der fusionierte GST-Tag keine Beeinträchtigung der Funktion von *CaVPS34* bewirkt.



**Abb. 3.11: Komplementation einer *S. cerevisiae* *vps34*-Deletionsmutante durch Überexpression von *CaVPS34*.** Das Wachstum der *S. cerevisiae* *vps34*-Mutante PHY102 [*vps34*] (Hermann und Emr, 1990) wurde vor und nach Transformation mit dem *CaVPS34* enthaltenden Plasmid pYGAB1 [*vps34*+*CaVPS34*] untersucht. Außerdem wurden eine Transformante, welche pYGAB1 wieder verloren hatte [*vps34*(*CaVPS34*-loss)], sowie die mit dem insertfreien Vektor pYES2G transformierte Mutante [*vps34*+Vektor] in den Vergleich einbezogen. Als weitere Kontrolle [Wildtyp] diente der Stamm CEN.PK2 (Entian *et al.*, 1999). Die Stämme wurden für 4 Tage bei 30°C (permissive Temperatur) bzw. 37°C (nicht-permissive Temperatur) auf 2% Glukose bzw. 4% Galaktose inkubiert.

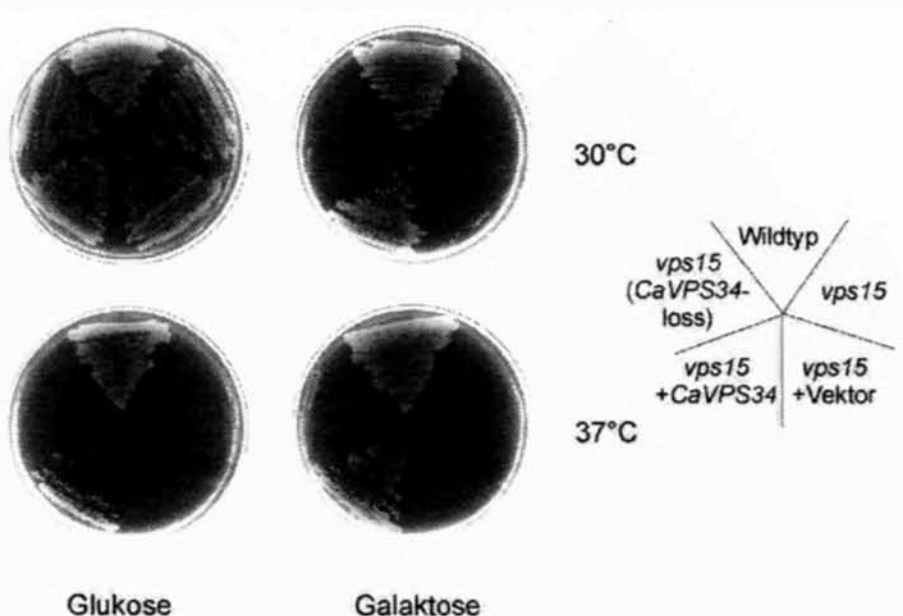
Von den durch Transformation des Stammes PHY102 mit pYGAB1 und anschließender Selektion auf YNB-Platten (leu, lys, trp) erhaltenen Klonen wurden, wie in Abschnitt 3.6.1 beschrieben, einige ausgewählt und in Sektorenausstrichen auf ihr Wachstum bei 30°C und 37°C untersucht. Dabei wurde durch die Wahl der C-Quelle die Expressionsstärke von *CaVPS34* variiert. Der *GAL1*-Promotor wird beim Wachstum auf 2% Glukose reprimiert. Durch 4% Galaktose erfolgt eine starke Induktion des Promoters, während 4% Raffinose im Medium als nicht-galaktosereprimierende C-Quelle wirkt. Die den *GAL1*-Promoter nicht reprimierende Raffinose kann von *S. cerevisiae vps34* unabhängig von der *vps34*-Mutation nicht als C-Quelle genutzt werden. Deshalb wurde in den Komplementationsexperimenten das Wachstum auf Galaktose und Glukose verglichen.

Wie aus Abbildung 3.11 hervorgeht, waren die getesteten Transformanten in der Lage, nach Induktion des *GAL1*-Promotors bei 30°C und 37°C zu wachsen. Damit konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von *CaVPS34* in *S. cerevisiae vps34* zur Komplementation des Phänotyps des temperatursensitiven Wachstums dieser Mutante führt. Die *vps34*-Mutante ist außerdem nicht in der Lage, auf Galaktose als nicht-fermentierbarer C-Quelle zu wachsen. Nach Überexpression von *CaVPS34* konnte auch dieser Defekt aufgehoben werden (Abb. 3.11). Somit wurde ein zweiter Phänotyp der *vps34*-Mutante durch *CaVPS34* komplementiert. Die Transformation von PHY102 (*vps34*) mit dem Ausgangsplasmid pYES2G diente dazu, einen eventuellen Effekt des reinen Vektors auf das Wachstum der *vps34*-Mutante zu erfassen. Abbildung 3.11 dokumentiert, daß durch pYES2G keine Verbesserung des Wachstums dieser Mutante vermittelt wird. Ein weiterer Kontrollversuch bestand in der Durchführung eines Plasmidverlust-Experimentes (Plasmid-Loss). Das Ziel dieses Versuches bestand darin zu zeigen, daß der Verlust aller Kopien des Plasmides pYGAB1 gleichzeitig zum Verschwinden des Komplementationsphänotyps führt. Zu diesem Zweck wurde von zwei Transformanten je eine Einzelkolonie resuspendiert und auf 5-FOA-haltigen Selektionsplatten (leu, lys, trp, ura) ausgespatelt. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation bei 30°C erfolgte die Selektion von uridinauxotrophen Klonen. Diese wurden nochmals durch paralleles Ausstreichen auf Platten mit und ohne Uridin überprüft. Anschließend erfolgte der Komplementationstest wie bereits beschrieben. Das fehlende Wachstum eines repräsentativen Klons bei 37°C sowie auf Galaktose (Abb. 3.11) bestätigt die Erwartung, daß mit dem Plasmidverlust die Wiederherstellung des Mutantenphänotyps einhergeht. Damit ist gezeigt, daß die beobachtete funktionelle Komplementation von *S. cerevisiae vps34* tatsächlich auf *CaVPS34* zurückzuführen ist.

### **3.6.3 Suppression des Wachstumsdefekts einer *S. cerevisiae vps15*-Mutante durch Überexpression von *CaVPS34***

Die Serin/Threonin-Proteinkinase Vps15p fungiert in *S. cerevisiae* als Adapterprotein, welches für die rezeptorvermittelte Rekrutierung von Vps34p zu spezifischen Membranabschnitten des Golgi verantwortlich ist (vgl. Abb. 1.4). Darüberhinaus wird eine Rolle von Vps15p bei der Aktivierung der Kinasefunktion von Vps34p diskutiert (Stack *et al.*,





**Abb. 3.12: Komplementation einer *S. cerevisiae* *vps15*-Deletionsmutante durch Überexpression von *CaVPS34*.** Folgende *S. cerevisiae*-Stämme wurden vergleichend untersucht: die untransformierte *vps15*-Mutante PH112 [*vps15*] (Hermann *et al.*, 1991), PH112 nach Transformation mit dem Vektor pYES2G [*vps15*+Vektor], PH112 nach Transformation mit dem *CaVPS34*-enthaltenden Plasmid pYGAB1 [*vps15*+*CaVPS34*], PH112 nach Verlust des vormals enthaltenen Plasmides pYGAB1 [*vps15*(*CaVPS34*-loss)], sowie der Stamm CEN.PK2 [Wildtyp]. Das Wachstum dieser Stämme wurde nach vier Tagen Inkubation bei 30°C (permissive Temperatur) bzw. 37°C (nicht-permissive Temperatur) auf Selektivagar mit 2% Glukose bzw. 4% Galaktose untersucht.

1993). So zeigt eine *S. cerevisiae* *vps15*-Mutante genau wie eine *vps34*-Mutante einen konditional-lethalen Phänotyp in Abhängigkeit von der Temperatur (Herman und Emr, 1990). Beide Mutanten weisen neben dem Wachstumsdefekt bei 37°C außerdem einen Defekt beim Wachstum auf Galaktose auf.

In einem analog Abschnitt 3.6.2 durchgeführten Komplementationsversuch konnte gezeigt werden, daß die Überexpression von *CaVPS34* in einer *S. cerevisiae* *vps15*-Deletionsmutante zur Aufhebung des temperatursensitiven Wachstumsdefektes dieser Mutante führt (Abb. 3.12). Außerdem war die Mutante nach Komplementation mit *CaVPS34* in der Lage, auf Galaktose zu wachsen. Zellen der mit dem Plasmid pYGAB1 transformierten *vps15*-Mutante exprimieren chromosomal *ScVPS34* und episomal *CaVPS34*. Die episodale Überexpression von *CaVPS34* führt dabei zur Suppression der durch die Deletion von *VPS15* hervorgerufenen Wachstums- und Galaktoseverwertungsdefekte. Die Beobachtung, daß auch auf 2% Glukose bei 37°C ein leichtes Wachstum des Transformantenstammes zu beobachten war, könnte auf eine unvollständige Repression des *GAL1*-Promotors zurückzuführen sein. So ist es denkbar, daß eine schwache Expression von *CaVPS34* zu der beobachteten teilweisen Suppression des Wachstumsdefektes von *S. cerevisiae* *vps15* führt, wenn man berücksichtigt, daß die Zellen bereits den normalen physiologischen Level des *S. cerevisiae*-Proteins Vps34p enthalten. Wie bei den Komplementationstests mit der *S. ce-*

*revisiae vps34*-Mutante wurde weiterhin untersucht, welchen Einfluß der Vektor pYES2G ohne *CaVPS34* auf das temperatursensitive Wachstum und die Galaktoseverwertung der *S. cerevisiae vps15*-Mutante ausübt. Analog Abschnitt 3.6.2 wurde außerdem ein Plasmidverlustexperiment durchgeführt. Diese Kontrollversuche bestätigten die Abhängigkeit der Suppression der untersuchten Phänotypen von *CaVPS34* (Abb. 3.12).

Zusammenfassend erbrachten die mit einer *S. cerevisiae vps34*- bzw. *vps15*-Deletionsmutante durchgeführten Komplementationsuntersuchungen folgendes Ergebnis: Der Versuch der Komplementation der *vps34*-Mutante durch *CaVPS34* auf einem "low-copy"-Plasmid und unter der Kontrolle seines eigenen Promotors führte nicht zur Wiederherstellung der Wachstumsfähigkeit der Mutante bei 37°C. Dagegen war *CaVPS34* bei Expression von einem "high-copy"-Plasmid und unter dem regulierbaren *GAL1*-Promoter aus *S. cerevisiae* in der Lage, sowohl den temperaturabhängigen Wachstumsdefekt als auch den Galaktoseverwertungsdefekt der *vps34*- bzw. *vps15*-Mutante zu supprimieren.

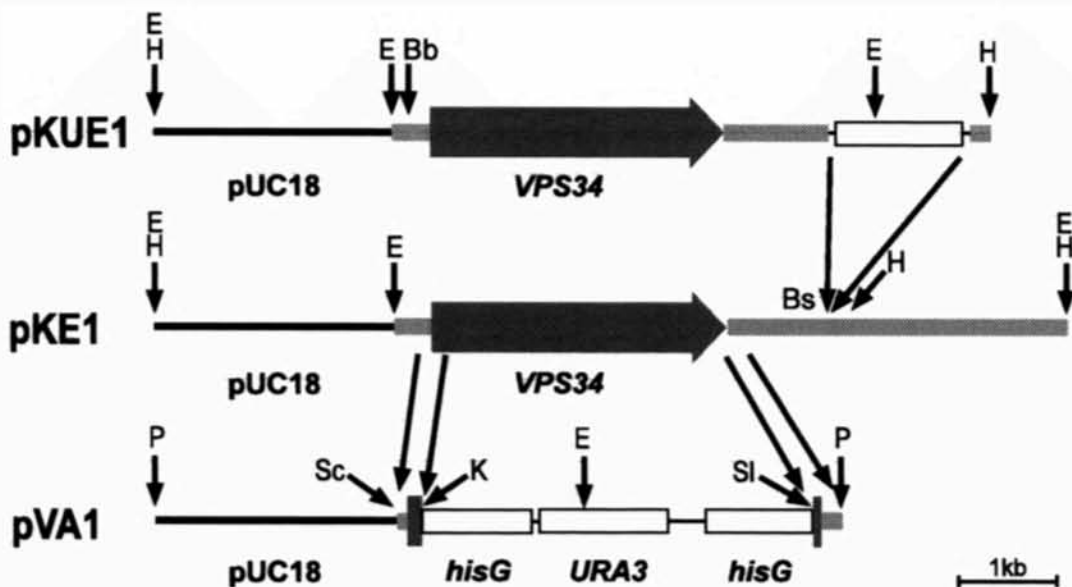
### **3.7 Disruption und Reintegration von *CaVPS34* im *C. albicans*-Stamm CAI4**

Eine wichtige Voraussetzung für die weitere funktionelle Charakterisierung von *CaVPS34* in *C. albicans* bildete die Herstellung einer *CaVPS34*-Nullmutante. Da *C. albicans* ein diploides Genom aufweist und bisher keine sexuelle Phase dieser Hefe beobachtet werden konnte, mußten dazu nacheinander beide Allele des Gens disruptiert werden. Die dabei angewandte Methode des *URA*-Blastings (Fonzi und Irwin, 1993) beinhaltet das Replacement von 94% der kodierenden Sequenz von *CaVPS34* durch eine Reportergen-Kassette.

Um nachzuweisen, daß die in *CaVPS34*-disruptierten Stämmen zu beobachtenden phänotypischen Charakteristika ursächlich auf das Fehlen einer bzw. beider Kopien des Gens zurückzuführen sind und nicht auf unerwünschten Nebeneffekten der Disruptionsprozedur beruhen, wurde *CaVPS34* in seinen ursprünglichen Genlocus reintegriert.

#### **3.7.1 Konstruktion der Disruptionskassette**

Zunächst erfolgte die Konstruktion der entsprechenden Disruptionskassette auf der Grundlage des Disruptionsvektors pMB7 (Fonzi und Irwin, 1993) wie in Abbildung 3.13 dargestellt. Im ersten Schritt wurde das Plasmid pVA0 konstruiert (nicht abgebildet). Dabei wurde mit Hilfe der in 2.2.1 angegebenen Primer PV1-*SacI* und PV2-*KpnI* ein 274 bp langes PCR-Produkt amplifiziert, welches 260 bp der 5'-Region von *CaVPS34* umfaßt. 150 bp davon entsprechen der kodierenden Sequenz, die verbleibenden 110 bp gehören zur Promotor-Region des Gens. Die zusätzlich amplifizierten Restriktionsorte *SacI* und *KpnI* wurden genutzt, um das Amplimer vor die *hisG-URA3-hisG*-Kassette zu klonieren. Den nächsten Schritt bildete ausgehend von pVA0 die Konstruktion des Plasmids pVA1. Unter Verwendung der PCR-Primer PV3-*SalI* und PV4-*PstI* (vgl. 2.2.1) wurde ein 241 bp-Produkt amplifiziert, welches 25 bp vom 3'-Ende der kodierenden Sequenz des Gens sowie



**Abb. 3.13: Disruption und Reintegration von *CaVPS34*.** Anhand der Restriktionskarten der Plasmide pKE1, pVA1 und pKUE1 ist die Konstruktion der Kassetten für die Disruption und Reintegration von *CaVPS34* schematisch dargestellt. In pKE1 ist *CaVPS34* auf einem genomischen 4,9 kb *EcoRI/HindIII*-Fragment enthalten. Die kodierende Sequenz des Gens wird durch den dicken schwarzen Pfeil symbolisiert. Zur Konstruktion des Disruptionsplasmids pVA1 wurden nacheinander die mittels PCR amplifizierte 5'- und 3'-Fragmente von *CaVPS34* flankierend zur 4,1 kb *hisG-URA3-hisG*-Kassette des Vektors pMB7 (Fonzi und Irwin, 1993) kloniert. Das verwendete Disruptionskonstrukt umfaßte das 4,6 kb *SacI/PstI*-Fragment aus pVA1. Im Plasmid pKUE1 wurde ein 1,3 kb *RsaI/XbaI* Fragment mit dem *URA3*-Gen in den downstream von *CaVPS34* gelegenen *BspMI*-Ort kloniert. Das 6,0 kb *BbvI/HindIII*-Fragment dieses Plasmids wurde zur Reintegration von *CaVPS34* genutzt. Restriktionsorte: *EcoRI*(E), *HindIII* (H), *KpnI* (K), *PstI* (P), *SacI* (Sc), *SalI* (Sl), *BbvI* (Bb), *BspMI* (Bs).

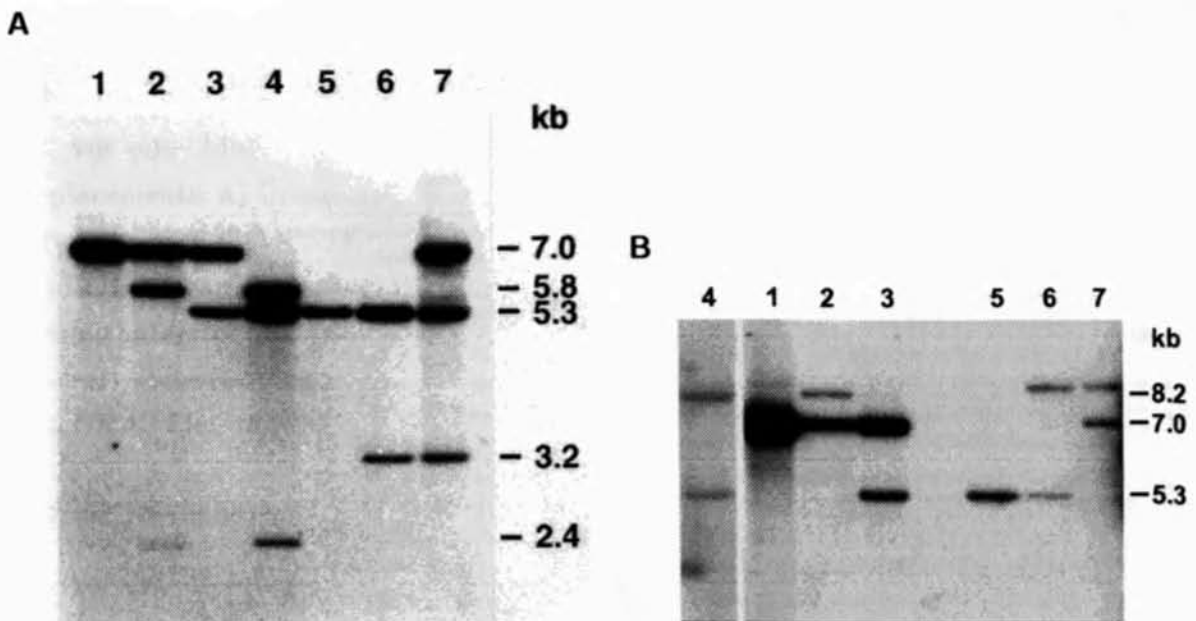
200 bp der stromabwärts gelegenen Terminatorsequenz umfaßt. Über die Restriktionsorte *SalI* und *PstI* wurde das PCR-Produkt in pVA0 hinter die *hisG-URA3-hisG*-Kassette kloniert. Das daraus resultierende Plasmid pVA1 (Abb. 3.13) enthält den *URA*-Blaster flankiert von beiden für die Rekombination in den *CaVPS34*-Locus von *C. albicans* *CaI4* benötigten Sequenzabschnitten. Für die Transformation in *C. albicans* wurde pVA1 mit *SacI* und *PstI* geschnitten und die Disruptionskassette als Fragment isoliert, da davon auszugehen ist, daß freie DNA-Enden das "crossing over" begünstigen.

### 3.7.2 Sequentielle Disruption beider *CaVPS34*-Allele in *C. albicans* *CAI4*

Das 4,6 kb *SacI/PstI*-Fragment des Plasmids pVA1 wurde eingesetzt, um den uridin-auxotrophen *C. albicans* Stamm *CAI4* zu transformieren. Von fünf nach drei Tagen Wachstum identifizierten uridinprototrophen Transformanten dieses ersten Disruptionsschrittes wurde genomische DNA isoliert und mittels Southern-Analyse auf ein korrektes Replacement untersucht. Dabei konnten zwei Transformanten identifiziert werden, bei denen ein *CaVPS34*-Allel in der gewünschten Weise durch die Disruptionskassette ersetzt worden war. Eine heterozygot *CaVPS34*-disruptierte Mutante (*CAV1*) wurde ausgewählt und zur Selektion auf Verlust des *URA3*-Gens auf 5-FOA sowie Uridin enthaltenden YNB-

Agarplatten eingesetzt. Durch die beiden *URA3* flankierenden *hisG*-Sequenzen wird die Häufigkeit eines solchen Rekombinationsereignisses von  $5 \times 10^{-6}$  auf  $5 \times 10^{-4}$  erhöht. Auf 5-FOA-haltigem Medium sind nur uridinprototrophe Stämme wachstumsfähig, da Stämme mit funktionsfähigem *URA3*-Gen 5-FOA in einen toxischen Metaboliten umwandeln. Sechs der so isolierten Klone wurden mittels Southern-Analyse überprüft. Bei allen Klonen konnte der Verlust des *URA3*-Gens und einer *hisG*-Kopie bestätigt werden. Einer dieser uridinauxotrophen Stämme (CAV2) wurde für eine erneute Transformation zur Disruption des zweiten *CaVPS34*-Allels ausgewählt. Zehn der erhaltenen Transformanten wurden wiederum mittels Southern-Analyse überprüft, wobei bei fünf Klonen die erfolgreiche Disruption des zweiten *CaVPS34* Allels bestätigt werden konnte (CAV3). Die Selektion uridinauxotropher Segreganten wurde mit vier homozygot *CaVPS34*-disruptierten Stämmen durchgeführt. Fünf der insgesamt 12 im Southern-Blot analysierten Stämme zeigten den erwarteten Verlust des *URA3*-Gens auch im zweiten disruptierten Allel (CAV4).

Die nach jedem Disruptions- bzw. Rekombinationsschritt durchgeführte Southern-Analyse ist anhand jeweils eines repräsentativen Stammes in Abbildung 3.14 A zusammenfassend dargestellt. Die chromosomale DNA der zu untersuchenden Stämme wurde mit *EcoRI* geschnitten. Nach Hybridisierung des Southernblots mit dem 4,9 kb *EcoRI*/*HindIII*-Fragment aus pKE2 zeigte der Wildtypstamm SC5314 eine 7,0 kb-Bande (Spur 1). In vorangegangenen Southern-Analysen war gezeigt worden, daß der zu SC5314 isogenische *URA*<sup>-</sup>-Stamm CAI4 bezüglich *CaVPS34* das gleiche Bandenmuster aufweist. Die hetero-



**Abb. 3.14: Southern-Analyse zur Überprüfung der Disruption und Reintegration von *CaVPS34*.** Chromosomale DNA der einzelnen *C. albicans*-Stämme wurde mit *EcoRI* (A) oder *HindIII* (B) geschnitten. Als Sonde diente jeweils das 4,9 kb *EcoRI*/*HindIII*-Fragment aus pKE2. Folgende *C. albicans*-Stämme wurden analysiert: Elternstamm SC5314 [1]; CAV1 (*VPS34/vps34::hisG-URA3-hisG*) [2]; CAV2 (*VPS34/vps34::hisG*) [3]; CAV3 (*vps34::hisG-URA3-hisG/vps34::hisG*) [4]; CAV4 (*vps34::hisG/vps34::hisG*) [5]; CAV5 (*vps34::hisG/VPS34-URA3*) [6]; CAV6 (*VPS34/VPS34-URA3*) [7].

zygote *CaVPS34*-Mutante CAV1 ist dadurch gekennzeichnet, daß neben der Wildtypbande zwei weitere Banden von 5,8 kb sowie 2,4 kb hybridisieren (Spur 2). Diese beiden Banden erhält man aufgrund des *EcoRI*-Ortes im *URA3*-Gen (Abb. 3.13) an Stelle einer 8,2 kb-Bande. Dadurch wurde bestätigt, daß ein 2,9 kb-Fragment eines *CaVPS34* Allels durch die 4,1 kb *hisG-URA3-hisG*-Kassette ersetzt worden war. Das Herausfallen des *URA3*-Gens sowie eines *hisG*-Elementes im abgeleiteten *URA*<sup>-</sup>-Stamm CAV2 resultierte in einer 5,3 kb-Bande (Spur 3). Die zweite Transformation mit dem Disruptionskonstrukt führte zur Isolierung einer *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3). Das Verschwinden der 7,0 kb Wildtypbande sowie die Größen der beiden verbleibenden Banden von 5,8 kb und 2,4 kb sind konsistent mit dem Replacement des zweiten *CaVPS34*-Allels durch die Disruptionskassette (Spur 4). Das Auftreten einer einzigen 5,3 kb-Bande in der *URA*<sup>-</sup>-Segregante CAV4 bestätigt die Existenz von zwei *hisG*-disruptierten *CaVPS34*-Allelen (Spur 5).

Mit der erfolgreichen Disruption beider *CaVPS34*-Allele war die Voraussetzung für eine umfassende funktionelle Charakterisierung des Gens gegeben. Daraus ergab sich außerdem die Erkenntnis, daß *CaVPS34* nicht essentiell für das Wachstum von *C. albicans* unter den gewählten Kultivierungsbedingungen ist.

### 3.7.3 Konstruktion der Reintegrationskassette

Die Konstruktion der Kassette zur Reintegration von *CaVPS34* in seinen ursprünglichen Genlocus (pKUE1) ist in Abbildung 3.13 dargestellt. Dazu wurde das *URA3*-Gen in den stromabwärts von *CaVPS34* gelegenen *BspMI*-Ort des Plasmids pKE2 kloniert (Abb. 3.13). Zur Transformation wurde das 6,0 kb *BbvI/HindIII*-Fragment des entstandenen Plasmids pKEU1 eingesetzt. Eine homologe Rekombination war demnach über Sequenzen vor oder hinter dem *URA3*-Gen möglich. Somit existieren folgende Varianten des Replacements: a) Integration des Konstruktes aus *CaVPS34* und *URA3*, b) alleinige Integration von *CaVPS34* und c) alleinige Integration von *URA3*. Durch Selektion auf Uriidinprototrophie waren nur solche Reintegranten lebensfähig, die das *URA3*-Gen ins Genom integriert hatten (a) und c)). Die Unterscheidung zwischen Transformanten, die die komplette Reintegrationskassette im Genom besitzen, und solchen, bei denen lediglich das *URA3*-Gen reintegriert worden war, erfolgte mittels Southern-Analyse (Abb. 3.14).

### 3.7.4 Reintegration von *CaVPS34* in das Genom der *CaVPS34*-Nullmutante

Die korrekte Reintegration von *CaVPS34* sowie *URA3* in den *CaVPS34*-Locus wurde nach Southern-Analyse durch das Auftreten einer zusätzlichen 3,2 kb-Bande bestätigt (Abb. 3.14 A). Die zweite hybridisierende Bande von 5,2 kb ist im Southernblot jedoch schwer von der 5,3 kb-Bande des disruptierten Allels unterscheidbar. Daraus ergab sich die Notwendigkeit einer zweiten Southernanalyse, bei der die chromosomale DNA mit *HindIII* geschnitten wurde (Abb. 3.14 B). Auf diese Weise wurde gleichzeitig die in Abbildung 3.14 A gezeigte schrittweise Disruption von *CaVPS34* bestätigt. Das *CaVPS34*-Wildtypallel ist nach einer *HindIII*-Spaltung 7,0 kb groß (Spur 1). Die heterozygote Disruption des Gens

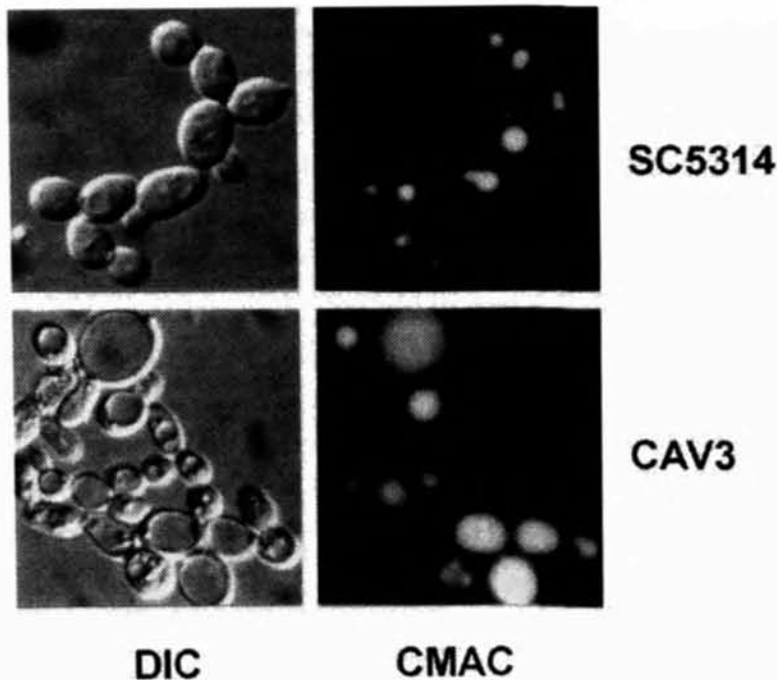
führt zu einer 8,2 kb-Bande (Spur 2), welche sich nach FOA-Selektion auf 5,3 kb verkürzt (Spur 3). Demzufolge zeigt die uridinprototrophe *CaVPS34*-Nullmutante ein 8,2 kb- und ein 5,3 kb-Signal (Spur 4), der resultierende uridinauxotrophe Stamm dagegen nur ein 5,3 kb-Signal (Spur 5). Durch das Auftreten eines 8,4 kb-Fragmentes wurde die Reintegration eines Allels von *CaVPS34* bestätigt (Spur 6). Dabei konnte nun gut zwischen disruptiertem (5,3 kb) und reintegriertem Allel (8,4 kb) unterschieden werden. Die Reintegration beider *CaVPS34*-Allele wurde durch die Detektion des Wildtypfragmentes und des 8,4 kb-Fragmentes verifiziert (Spur 7). In diesem Klon war bei einem disruptierten Allel die Integration der *CaVPS34-URA3*-Kassette und bei dem zweiten Allel die alleinige Reintegration von *CaVPS34* erfolgt.

### 3.8 Charakterisierung der *CaVPS34*-disruptierten Stämme

#### 3.8.1 Einfluß der Disruption von *CaVPS34* auf die Vakuolenmorphologie

Die phänotypische Charakterisierung der Mutanten wurde mit dem Vergleich morphologischer Charakteristika begonnen. Diese wie auch alle nachfolgenden Untersuchungen wurden mit den entsprechenden uridinprototrophen Stämmen (SC5314, CAV1, CAV3, CAV5, CAV6) durchgeführt.

Das Durchmustern der Zellen mittels differentieller Interferenzkontrastmikroskopie (Nomarski) ergab deutliche Unterschiede zwischen dem Wildtypstamm (SC5314) und der



**Abb. 3.15: Vakuolenmorphologie von *C. albicans*.** Der Wildtypstamm SC5314 und die *CaVPS34*-Nullmutante CAV3 wurden mit einem Fluoreszenzfarbstoff zur Darstellung des Vakuolenlumens (Cell-Tracker Blue CMAC, Molecular Probes) angefärbt. Bei der fluoreszenzmikroskopischen Betrachtung der Zellen (CMAC) und im differentiellen Interferenzkontrast (DIC) zeigte die Nullmutante stark vergrößerte Vakuolen.

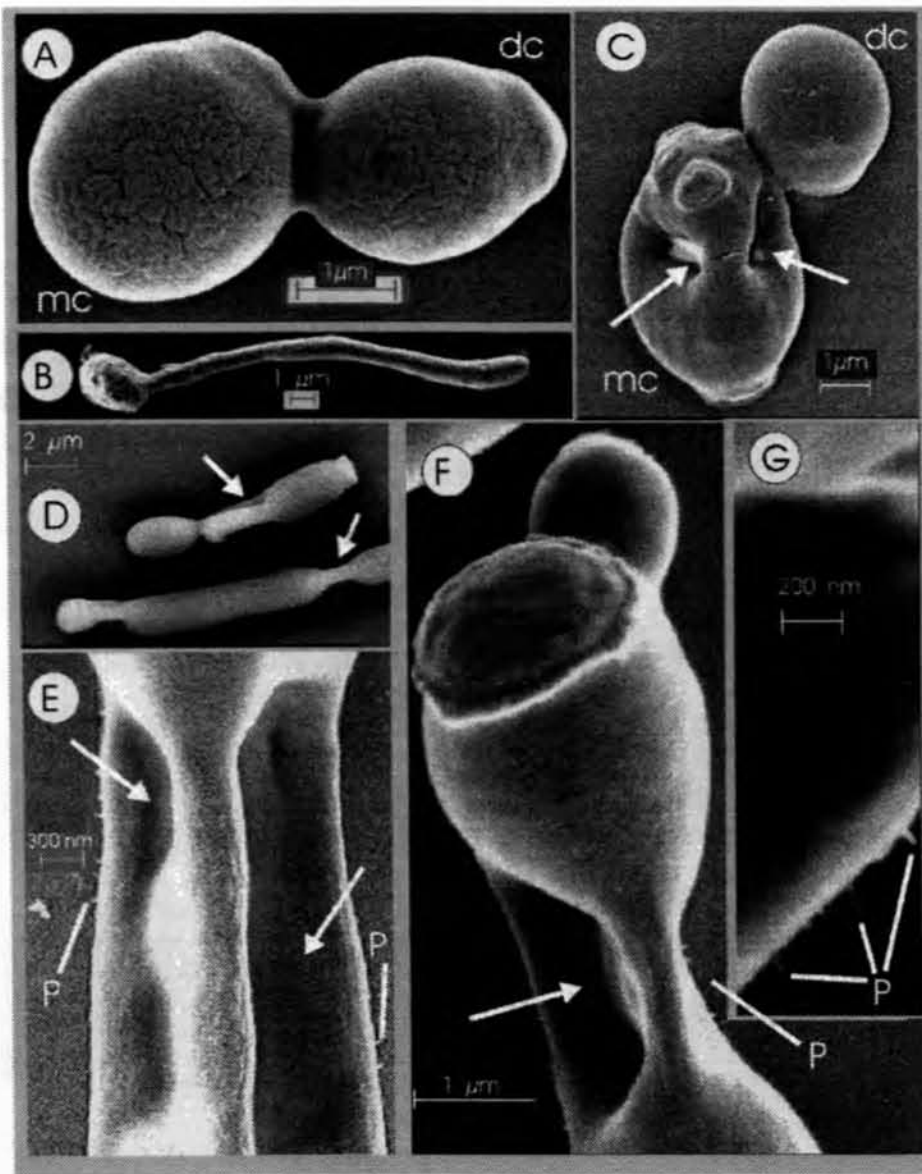


*CaVPS34*-Nullmutante (CAV3). Während in den Zellen des Wildtypstammes kleine Vakuolen sichtbar waren, deren Durchmesser höchstens die Hälfte des Zelldurchmessers, überwiegend jedoch weniger betrug, waren die Vakuolen der Nullmutante stark vergrößert (Abb. 3.15). Bei einem hohen Anteil dieser Zellen füllte die Vakuole nahezu das gesamte Zellumen aus. Auffällig war weiterhin die Größe der Zellen der Nullmutante, welche im Durchschnitt das 1,5-fache der SC5314-Zellen betrug und eine Konsequenz der Vakuolenvergrößerung zu sein scheint. Die zum Teil enorm vergrößerten Vakuolen der Nullmutante wurden noch eindrucksvoller mit Hilfe der Fluoreszenzmikroskopie verdeutlicht (Abb. 3.15). Dazu wurden die Zellen mit einem speziellen Fluoreszenzfarbstoff (CellTrackerBlue CMAC) inkubiert, welcher in die lebende Zelle hineintransportiert wird und sich selektiv im Vakuolenlumen akkumuliert. Wie der hohe Anteil von Zellen mit auffallend großen Vakuolen zeigt, führt die Nullmutation von *CaVPS34* zu einer Veränderung der Vakuolenmorphologie. Der heterozygot *CaVPS34*-disruptierte Stamm CAV1 und die beiden Revertantenstämme CAV5 und CAV6 wiesen dagegen keinen Unterschied zur Wildtypmorphologie auf (nicht abgebildet).

### **3.8.2 Strukturelle Besonderheiten der Zelloberfläche der *CaVPS34*-Nullmutante**

Die rasterelektronenmikroskopische Untersuchung von Zellen der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) sollte dazu dienen, mögliche morphologische bzw. strukturelle Unterschiede an der Zelloberfläche im Vergleich zum Wildtypstamm (SC5314) zu erkennen. Dazu wurden sowohl Hefezellen aus der logarithmischen Wachstumsphase als auch Hyphenzellen von SC5314 und CAV3 im Rasterelektronenmikroskop (REM) verglichen (Abb. 3.16). Als ein auffälliges Merkmal von Zellen der Nullmutante traten dabei ausgeprägte Invaginationen in Erscheinung (Abb. 3.16 C-F). Diese stellen wahrscheinlich durch die vergrößerten Vakuolen verursachte Präparationsartefakte dar. So wurden solche Invaginationen vor allem in Zellen beobachtet, die eine besonders große Vakuole besaßen (Mutterzellen, ältere Hyphen), was darauf hinweist, daß die Stabilität dieser Zellen herabgesetzt ist. Wildtypzellen zeigten diesen Effekt dagegen nicht (Abb. 3.16 A, B).

Ein weiterer deutlicher Unterschied zwischen Wildtyp und Mutante zeigte sich durch das Auftreten von aberranten Oberflächenstrukturen, die als Pili bezeichnet werden können, an hyphalen Zellen der Nullmutante. Diese 30-120 nm langen und 15-20 nm breiten Pili waren bei einem Teil der Mutantenzellen beobachtbar (Abb. 3.16 D-G), während sie bei Wildtypzellen vollständig fehlten. Charakteristisch ist auch die Lokalisierung dieser Pili besonders in den Arealen, die von Invaginationen betroffen waren (Abb. 3.16 E,F). Ihre Konzentration in diesen Oberflächenabschnitten könnte möglicherweise ebenfalls im Zusammenhang mit den ursprünglich darunter gelegenen großen Vakuolen gesehen werden.

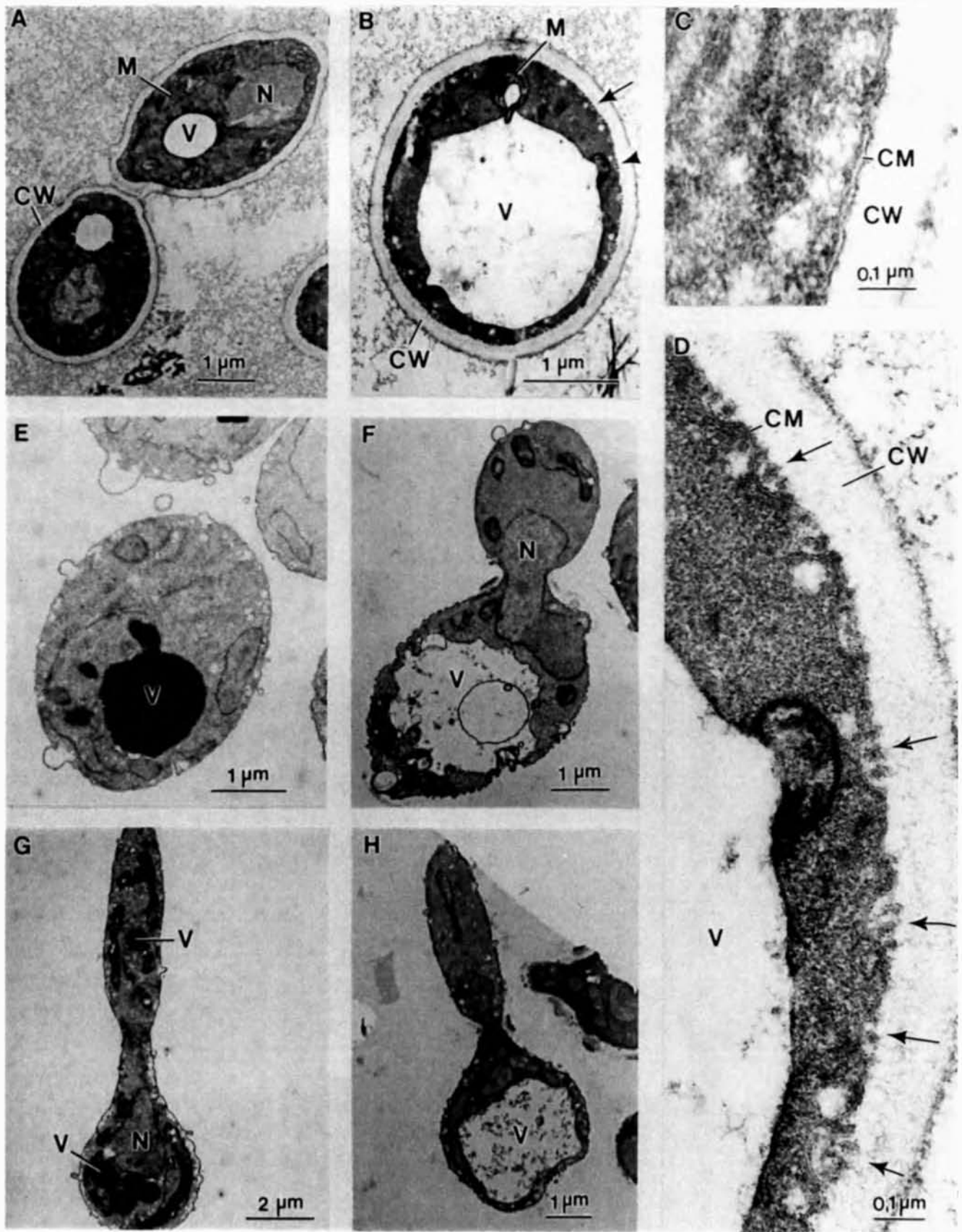


**Abb. 3.16: Rasterelektronenmikroskopische Analyse von *C. albicans*.** Vergleich des Wildtypstammes SC5314 in der Hefeform (A, B) bzw. als hyphale Zellen (C) mit der *CaVPS34*-Nullmutante CAV3 bei hefigem (D) bzw. filamentösem Wachstum (E, F, G). Pfeile zeigen Invaginationen an und Balken weisen auf Pilus-ähnliche Strukturen hin. mc Mutterzelle, dc Tochterzelle, P Pili

### 3.8.3 Ultrastrukturelle Merkmale der *CaVPS34*-Nullmutante

Für die Analyse der Ultrastruktur von intakten *C. albicans*-Zellen einschließlich Zellwand und periplasmatischem Raum wurden die Zellen unter Anwendung einer  $\text{KMnO}_4/\text{OsO}_4$ -Methode (vgl. 2.5.3) präpariert. Dabei wurden wiederum Zellen des Wildtypstammes SC5314 und der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) verglichen. Bei der Betrachtung der Mutantenzellen am Transmissionselektronenmikroskop (TEM) zeigte sich unter sehr starker Vergrößerung (1:17 000, 1:36 000) eine auffällige aberrante Akkumulation von Vesikeln an der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran (Abb. 3.17 B, D). Dabei traten die Vesikelakkumulationen jeweils fleckartig konzentriert auf. Diese "Patches" wiederum sind entlang der gesamten Plasmamembran verteilt sichtbar, wobei sie durch Invagina-





**Abb. 3.17: TEM-Untersuchung der Nullmutante im Vergleich zu SC5314.** Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden nach einer KMnO<sub>4</sub>-Fixierungsmethode präpariert (A-D) oder protoplastiert und einer OTO-Membrankontrastierungsprozedur unterzogen (E, F). Letztere Methode wurde auch angewandt, um hyphenbildende Zellen zu analysieren (G, H). SC5314 (A,C,E,G), Nullmutante (B,D,F,H), V Vakuole, CM Cytoplasmamembran, CW Zellwand, M Mitochondrium, N Nukleus

tionen der Cytoplasmamembran vom Zellinneren abgegrenzt werden. Geht man von der TEM-Abbildung eines Ultradünnschnittes aus, so beträgt das Ausmaß der "Patches" in der Ebene längs der Plasmamembran 100-270 nm, während die ins Zellinnere gerichtete Ausdehnung 50-100 nm umfaßt. Die darin akkumulierten Mikrovesikel haben einen Durchmesser von 20-30 nm. Pro "Patch" sind in der betrachteten Schnittebene durchschnittlich fünf Mikrovesikel erkennbar, es wurden aber auch bis zu zehn Vesikel gezählt. Ihr von einem Lipidbilayer umschlossener Inhalt erscheint im Gegensatz zu der sie umgebenden nur schwach strukturierten Grundsubstanz elektronendicht.

Neben der Untersuchung intakter *C. albicans*-Zellen wurde eine zweite Präparationsmethode angewandt, die an die Protoplastierung der Zellen gebunden war und eine Verstärkung des Kontrastes von Lipidmembranen und glykomolekülhaltigen Strukturen zum Ziel hatte (*Osmium-Thiocarbohydrazid-Osmium* (OTO)-Membrankontrastierung, vgl. 2.5.3). Mit dieser Methode wurden sowohl Hefezellen als auch hyphenbildende Zellen von *C. albicans* SC5314 und CAV3 (*vps34/vps34*) untersucht. Der wesentliche Unterschied der in Abbildung 3.17 (E-H) dargestellten Protoplasten besteht darin, daß die Vakuolen des Wildtypstammes elektronendicht sind, während die Vakuolen der *CaVPS34*-Nullmutante elektronentransparent erscheinen. Als Ursache hierfür ist wahrscheinlich eine abweichende Zusammensetzung des Vakuoleninhalts der Nullmutante anzusehen. Abbildung 3.17 verdeutlicht außerdem nochmals den Größenunterschied der Vakuolen von Wildtyp und Mutante, der durch Serienschnitte (nicht gezeigt) belegt werden konnte.

#### **3.8.4 Lipidkinaseaktivität in *C. albicans* nach Disruption von *CaVPS34***

In Abschnitt 3.5.4 ist gezeigt worden, daß Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 nur eine sehr geringe PI3-Kinase-Aktivität aufweisen. Nach Durchführung eines PI3-Kinase-Assays konnte bei Verwendung der Membranfraktion (P100) eines *C. albicans* SC5314-Proteinextraktes die Bildung von PI(3)P dünnschichtchromatografisch detektiert werden (Abb. 3.5.4). Vergleichend dazu wurden aus der mittleren logarithmischen Wachstumsphase gewonnene fraktionierte Proteinextrakte (S100, P100) der Nullmutante (CAV3) untersucht. Dabei konnte weder in der cytosolischen (S100) noch in der Membranfraktion (P100) eine Bildung von PI(3)P detektiert werden (Abb. 3.10 in Abschnitt 3.5.4). Demnach besitzt die *CaVPS34*-Nullmutante im Unterschied zum Wildtypstamm keine unter den gewählten Bedingungen nachweisbare PI3-Kinase-Aktivität.

#### **3.8.5 Wachstumsanalyse der *CaVPS34*-disruptierten *C. albicans*-Stämme**

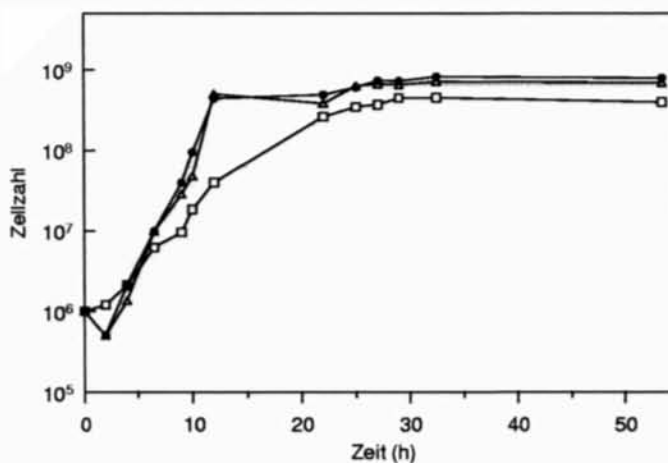
Ein Vergleich der Wachstumsgeschwindigkeiten von Mutantenstämmen mit dem entsprechenden Wildtypstamm gibt Aufschluß über mögliche durch die Mutation verursachte Wachstumsdefekte. So ist aus Experimenten mit *S. cerevisiae* bekannt, daß eine *vps34*-Deletionsmutante bei 26°C ein leicht verlangsamtes Wachstum zeigt (Herman und Emr, 1990). Durch eine Wachstumsanalyse der *CaVPS34*-Mutanten wurde untersucht, ob die in einem bzw. beiden *CaVPS34*-Allelen disruptierten *C. albicans*-Stämme eine ähnliche

Stamm	Genotyp	Verdopplungszeit (min)	
		YPD	YNB
SC5314	<i>VPS34/VPS34</i>	90	114
CAV1	<i>vps34/VPS34</i>	88	114
CAV3	<i>vps34/vps34</i>	162	198
CAV5	<i>vps34/(VPS34)</i>	90	114

**Tab. 3.3: Wachstumsanalyse von *C. albicans* in YPD- und YNB-Medium.** Das Wachstum der einzelnen Stämme wurde bei 28°C durch die Bestimmung der Zellzahl (mindestens zweifach) verfolgt. Die Generationszeiten des Wildtypstammes SC5314 sowie der heterozygoten Mutante (CAV1) und der heterozygoten Revertante (CAV5) waren jeweils gleich, während die *CaVPS34*-Nullmutante ein verlangsamtes Wachstum zeigte.

Wachstumsverzögerung aufweisen. Dazu wurden Wachstumskurven der Stämme SC5314, CAV1 (heterozygote Disruptante), CAV3 (Nullmutante) und CAV5 (heterozygote Revertante) in YPD-Medium bei 28°C aufgenommen. Das Wachstum wurde durch die Bestimmung der Zellzahl über einen Zeitraum von 24 h bzw. 54 h verfolgt. Ergänzend erfolgte die Bestimmung der Wachstumsgeschwindigkeit in YNB-Medium bei 28°C. Ein Vergleich des Wachstums der einzelnen Stämme bei 37°C war nicht direkt möglich, da der Wildtypstamm wie auch die eine Kopie von *CaVPS34* enthaltenden Stämme bei dieser Temperatur auch in YNB-Medium teilweise zu hyphalem Wachstum übergingen. Die Verdopplungszeit der *CaVPS34*-Nullmutante konnte dagegen in YNB-Medium auch bei 37°C bestimmt werden, da diese keine Hyphenbildung zeigte. Dabei wurde festgestellt, daß die Nullmutante in YNB-Medium bei 37°C (Generationszeit: 180 min) etwas schneller als bei 28°C (Generationszeit: 198 min) wächst.

Wie aus Tabelle 3.3 und Abbildung 3.18 hervorgeht, hatte die Disruption eines *CaVPS34*-Allels keinen Einfluß auf das Wachstum von *C. albicans*. Ein funktionsfähiges Allel des Gens ist demnach ausreichend, um ein normales Ablaufen der Wachstumsprozesse zu



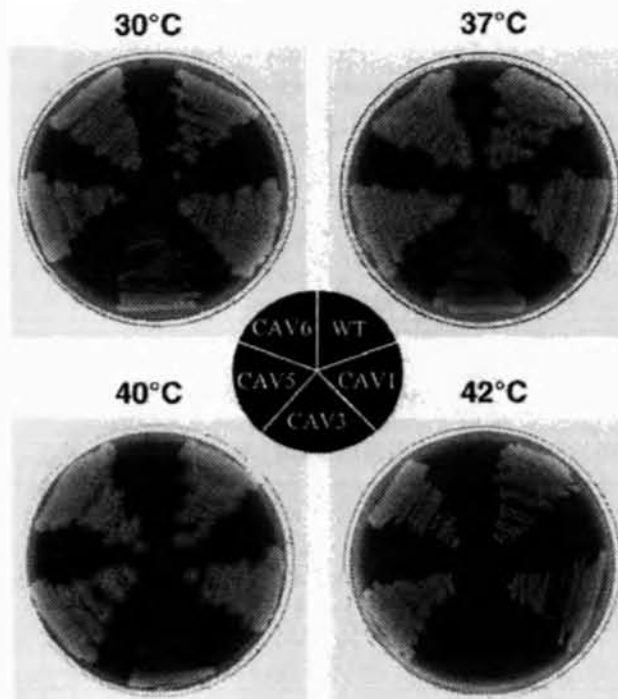
**Abb. 3.18: Wachstumsverlauf von *C. albicans* SC5314, CAV1 und CAV3 in YPD-Medium bei 28°C.** Der Wildtypstamm (●) und die heterozygote Mutante (Δ) zeigen keinen Wachstumsunterschied, während die *CaVPS34*-Nullmutante (□) etwas langsamer wächst.

gewährleisten. Im Gegensatz dazu führt die Disruption beider *CaVPS34*-Allele zu einer leichten Verringerung der Wachstumsgeschwindigkeit und damit zu einer Verlängerung der Verdopplungszeit. Diesen Effekt kann man im Zusammenhang mit den beobachteten morphologischen Veränderungen in der *CaVPS34*-Nullmutante sehen. Da die Zellen vergrößerte Vakuolen aufweisen und insgesamt größer sind als Wildtypzellen (vgl. 3.8.1), entspricht das etwas langsamere Wachstum der *CaVPS34*-Nullmutante den Erwartungen.

### 3.8.6 Einfluß von *CaVPS34* auf die Sensitivität gegenüber Temperatur- und Osmostreß

Im Hinblick auf die Funktion von CaVps34p während einer systemischen Infektion, bei der sich *C. albicans* unter den Bedingungen der Körpertemperatur des Wirtsorganismus sehr stark vermehren kann, war es von Interesse zu klären, ob die Disruption von *CaVPS34* möglicherweise eine erhöhte Temperatursensitivität von *C. albicans* zur Folge hat.

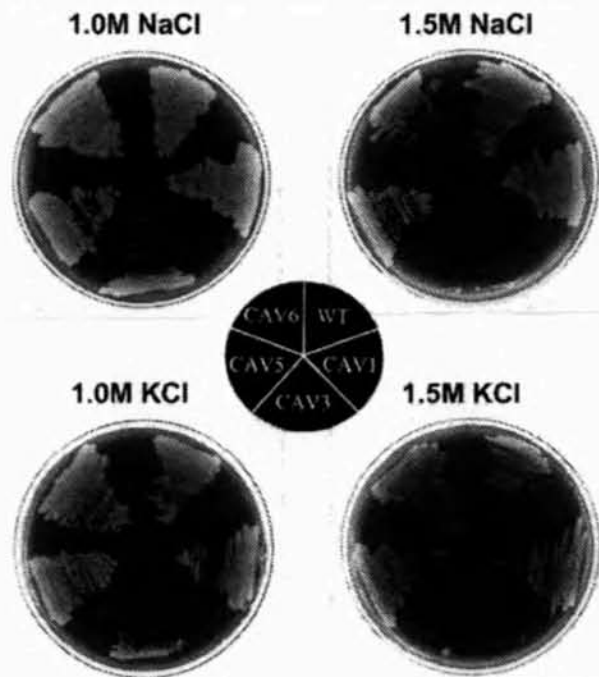
Die entsprechenden vergleichenden Untersuchungen zur Temperatursensitivität des Wildtypstammes SC5314 und der Mutanten- und Revertantenstämme wurden auf YPD-Agarplatten durchgeführt, wobei die Inkubation bei 30°C, 37°C, 40°C und 42°C erfolgte. Abbildung 3.19 zeigt die nach drei Tagen beobachteten Wachstumsunterschiede. Der Wildtypstamm, der heterozygot disruptierte Stamm sowie der heterozygote und der homozygote Revertantenstamm zeigten bei Temperaturen bis 40°C ein normales und bei 42°C ein leicht verlangsamtes Wachstum. Die *CaVPS34*-Nullmutante war demgegenüber in ihrem



**Abb. 3.19: Wachstum von *C. albicans* bei verschiedenen Temperaturen.** Die Stämme SC5314, CAV1, CAV3, CAV5 und CAV6 wurden auf YPD-Agarplatten ausgestrichen und drei Tage bei 30°C, 37°C, 40°C und 42°C inkubiert. Die *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) zeigt eine gesteigerte Sensitivität gegenüber Streß durch erhöhte Temperaturen von 40°C und 42°C.

Wachstum bereits bei 40°C eingeschränkt und nicht in der Lage, bei einer Temperatur von 42°C zu wachsen. Bei 37°C wurde keine Verschlechterung des Wachstums gegenüber 30°C beobachtet. Im Vergleich zu den anderen getesteten Stämmen ist das Wachstum der Nullmutante jedoch auch auf festen Medien insgesamt etwas verzögert. Somit kann festgestellt werden, daß die Nullmutation von *CaVPS34* zu einer Erhöhung der Sensitivität von *C. albicans* gegenüber Temperaturstreß führt. Dieser Effekt ist jedoch im Vergleich zu einer *S. cerevisiae vps34*-Deletionsmutante, welche bereits bei 37°C nicht mehr wächst, weniger stark ausgeprägt.

Ein weiterer Streßfaktor, welcher bei der Besiedelung bestimmter Mikrohabitate des Wirtsorganismus eine Rolle spielen kann, ist hyperosmotischer Streß (Odds, 1988). *S. cerevisiae vps34* sowie *S. pombe vps34*-Mutanten zeigen eine erhöhte Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Streß durch NaCl (Stack *et al.*, 1993; Kimura *et al.*, 1995). Um festzustellen, ob der Verlust von *VPS34* in *C. albicans* einen Effekt auf die Anpassung an Osmostreß ausübt, wurden die *C. albicans*-Stämme SC5314, CAV1, CAV3, CAV5 und CAV6 hinsichtlich ihrer Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Streß verglichen. Abbildung 3.20 zeigt, daß das Wachstum der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) in Gegenwart von 1,0 M NaCl verzögert und bei einer Konzentration von 1,5 M NaCl fast vollständig gehemmt wurde. Der gleiche Effekt wurde durch die entsprechenden Konzentrationen von KCl ausgelöst. Die beobachtete Sensitivität der *CaVPS34*-Nullmutante gegenüber hyperosmotischem Streß wurde durch die Erhöhung der Temperatur auf 37°C noch verstärkt



**Abb. 3.20: Wachstum von *C. albicans* unter hyperosmotischem Streß.** Die Stämme SC5314, CAV1, CAV3, CAV5 und CAV6 wurden auf YPD-Agarplatten mit 1 M und 1,5 M NaCl bzw. KCl ausgestrichen und drei Tage bei 30°C inkubiert. Die *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) zeigte eine erhöhte Sensitivität gegenüber hyperosmotischem Streß, während das Wachstum der übrigen getesteten Stämme nicht beeinträchtigt wurde.



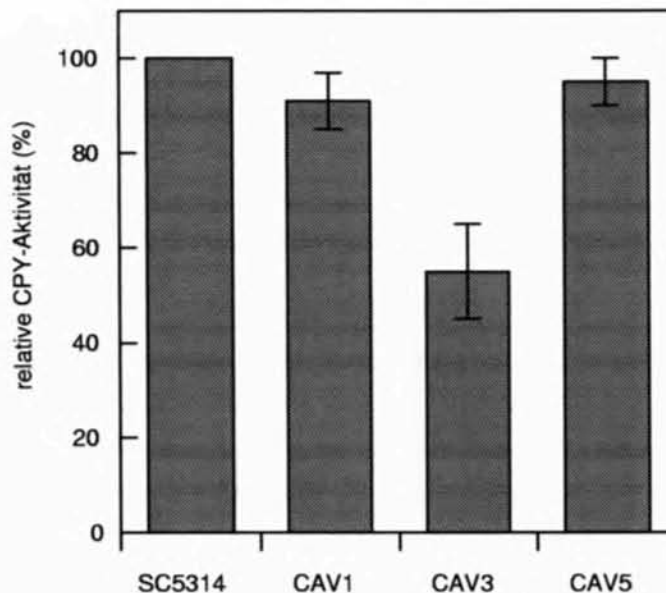
(nicht abgebildet). Auf das Wachstum der übrigen getesteten Stämme hatten die gewählten Streßbedingungen keinen bzw. nur einen geringen Einfluß. Daraus läßt sich schließen, daß *CaVPS34* eine wichtige Rolle bei der Anpassung von *C. albicans* an hyperosmotischen Streß spielt.

### 3.8.7 Einfluß von *CaVPS34* auf die Aktivität der Carboxypeptidase Y

Die Sekretion der vakuolären Hydrolase Carboxypeptidase Y (CPY) ist ein wichtiges Merkmal der *S. cerevisiae vps34*-Mutante. Dabei führt das Fehlen von Vps34p in *S. cerevisiae* zu einer Fehlleitung ("missorting") der CPY in den sekretorischen Pathway, infolgedessen die Hydrolase als inaktive Vorstufe aus der Zelle ausgeschleußt wird. Dieser Effekt konnte bei *S. cerevisiae* sehr eindrucksvoll mit Hilfe von Antikörpern gegen die CPY nachgewiesen werden (Herman und Emr, 1990).

In *C. albicans* sind vakuoläre Proteine bisher noch sehr wenig charakterisiert. Zwar ist das Gen für die CPY in *C. albicans* kloniert und sequenziert (Mukhtar *et al.*, 1992), doch sind derzeit noch keine Antikörper gegen diese vakuoläre Hydrolase verfügbar. Auch der Transport anderer vakuolärer Hydrolasen konnte aufgrund fehlender Antiseren immunochemisch bisher nicht untersucht werden. Für eine Beteiligung von *C. albicans* Vps34p am biosynthetischen Proteintransport vom Golgi zur Vakuole spricht neben seiner Sequenzhomologie zu ScVps34p und seiner *in vitro*-PI3-Kinase-Aktivität auch der Befund, daß *CaVPS34* eine *S. cerevisiae vps34*-Nullmutante komplementieren kann (vgl. 3.6.2).

Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß die CPY erst in der Vakuole in ihre reife und aktive



**Abb. 3.21: Gesamtaktivität der Carboxypeptidase Y in *C. albicans*.** Es wurden die Stämme SC5314, CAV1(*vps34/VPS34*), CAV3(*vps34/vps34*) und CAV5(*vps34/[VPS34]*) in zwei unabhängigen Tests mittels eines Mikrotiterplattenassays nach Woolford *et al.* (1986) untersucht. Die gemessene CPY-Aktivität des Wildtypstammes SC5314 wurde als Bezugswert auf 100% gesetzt. Dargestellt sind dementsprechend die relativen Werte der Stämme CAV1, CAV3 und CAV5 sowie deren Standardabweichungen.

Form umgewandelt wird (Hasilik *et al.*, 1978; Hemmings *et al.*, 1981; Stevens *et al.*, 1982). Ausgehend von der Annahme, daß CPY wahrscheinlich auch in *C. albicans* einem entsprechenden Aktivierungsprozeß in der Vakuole unterliegt, wurden CPY-Aktivitätstests ganzer Zellen von *C. albicans* durchgeführt. Dabei wurde in einem Mikrotiterplattentest in Zellen von *C. albicans* SC5314 und CAV3 sowie CAV1 und CAV5 jeweils die Gesamtkaktivität der CPY bestimmt, wobei der für *S. cerevisiae* beschriebene CPY-spezifische Enzymtest nach Woolford *et al.* (1986) für *C. albicans* übernommen wurde. Abbildung 3.21 gibt die in zwei unabhängigen Versuchen mit je 20 Parallelen bestimmten relativen CPY-Aktivitäten der getesteten Stämme wieder. Dabei wurde die gemessene CPY-Aktivität des Wildtypstammes als 100% festgesetzt und die Aktivitäten der anderen Stämme jeweils relativ dazu angegeben.

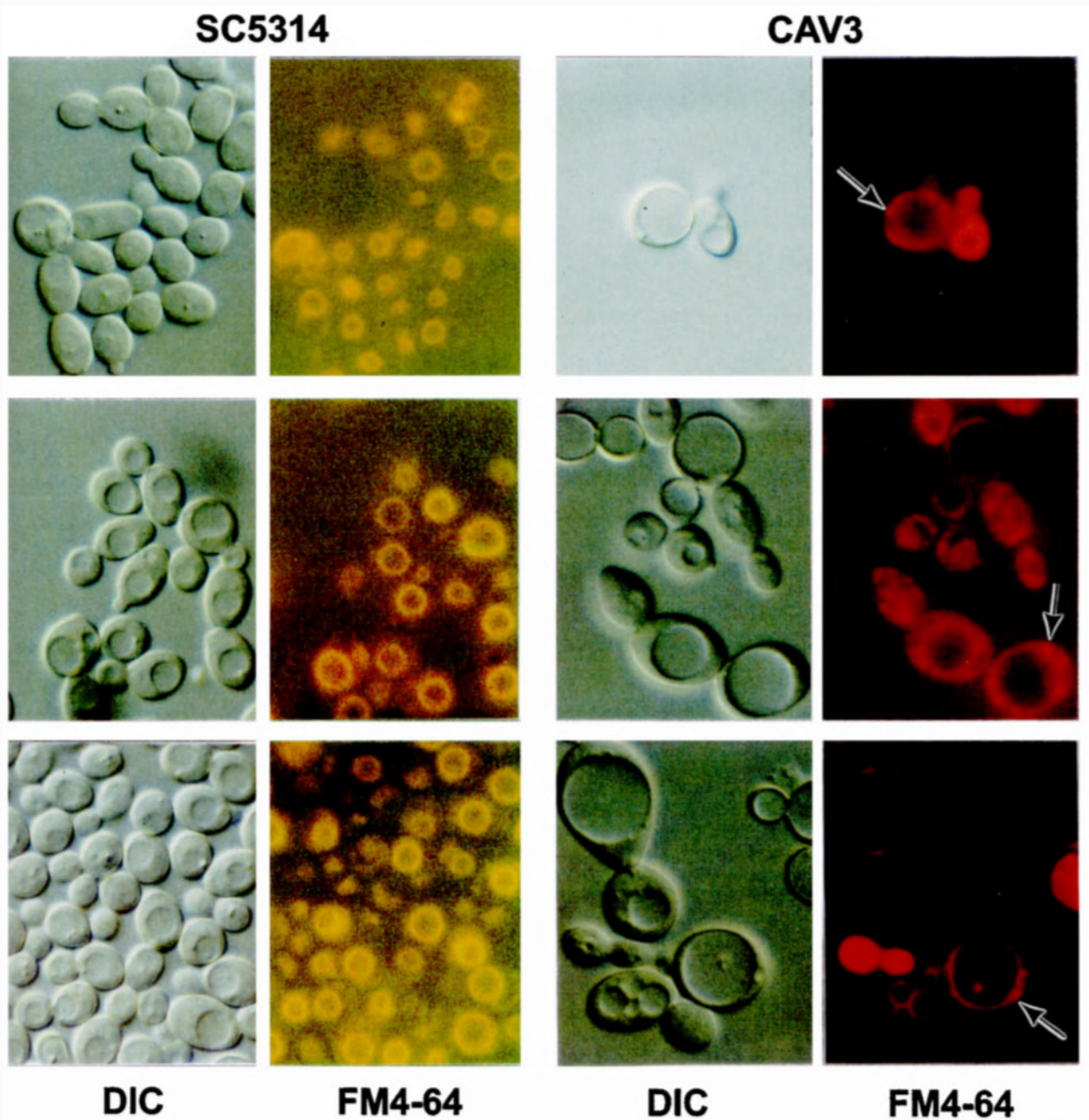
Die Disruption einer Kopie von *CaVPS34* (CAV1) hatte keinen hochsignifikanten Effekt auf die Gesamt-CPY-Aktivität der Zellen ( $91\% \pm 6\%$ ). Dies trifft auch für die Einfach-Revertante CAV5 zu ( $95\% \pm 5\%$ ). Zwischen den Werten der Stämme CAV1 und CAV5 sowie zwischen CAV5 und SC5314 liegt keine Signifikanz vor. Der Einfluß der Disruption einer Kopie von *CaVPS34* auf die Gesamt-CPY-Aktivität ist daher als gering anzusehen. Die Disruption beider Kopien von *CaVPS34* verursachte dagegen einen hochsignifikanten Effekt bezüglich der relativen Gesamt-CPY-Aktivität. Die mit  $55\% \pm 10\%$  der Aktivität des Wildtypstammes deutlich geringere CPY-Gesamtkaktivität der *CaVPS34*-Nullmutante zeigt, daß die Disruption von *CaVPS34* einen deutlichen Einfluß auf die Aktivität einer vakuolären Hydrolase hat. In Anlehnung an die Befunde aus *S. cerevisiae* zu Transport und Aktivierung der CPY kann vermutet werden, daß die Ursache dafür im gestörten Transport des Präproteins in die Vakuole und der damit verbundenen unzureichenden Aktivierung der Carboxypeptidase Y liegt. Somit kann die Bestimmung der Gesamtkaktivität der CPY in *C. albicans* als ein indirekter Hinweis auf die Beteiligung von *CaVps34p* am Transport der CPY vom Golgi in die Vakuole angesehen werden.

### 3.8.8 Einfluß von *CaVPS34* auf den endocytischen Vesikeltransport

Experimente mit *S. cerevisiae* belegen, daß die Inaktivierung von *VPS34* wahrscheinlich die Fusion von späten endosomalen Kompartimenten, welche auch als multivesikuläre Körper (MVB's) bezeichnet werden können, mit der Vakuole verhindert (Wurmser und Emr, 1998). Inwieweit ein vergleichbarer Einfluß auf Endocytosevorgänge im Zusammenhang mit *VPS34* auch bei *C. albicans* zu beobachten ist, sollte durch Pulse-Chase-Experimente mit dem fluoreszenten Endocytosemarker FM4-64 geklärt werden. Dieser ist ein lipophiler Styrylfarbstoff, welcher in Membranlipidbilayer interkaliert und über den endocytischen Pathway bis hin zur Vakuolenmembran transportiert wird (Vida und Emr, 1995; Wendland *et al.*, 1996).

Zellen des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 und der *CaVPS34*-Nullmutante wurden mit FM4-64 gefärbt ("Pulse") und anschließend für 30, 60 und 120 min einer "Chase"-Inkubation unterworfen, um den Transport des Endocytosemarkers verfolgen zu können

(Abb. 3.22). Im *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 wurde bereits nach 30 min wie auch nach 60 und 120 min ausschließlich die Vakuolenmembran angefärbt (Ringfärbungsmuster). Die *CaVPS34*-Nullmutante zeigte nach 30 min dagegen nur eine sehr schwach gefärbte Vakuolenmembran. Auffällig war dabei eine Vielzahl kleiner punktartiger Strukturen außerhalb der Vakuole, in denen der Farbstoff akkumulierte. Außerdem war eine diffuse Fluoreszenz des Cytoplasmas zu erkennen. Nach 60 min und auch nach 120 min erschie-



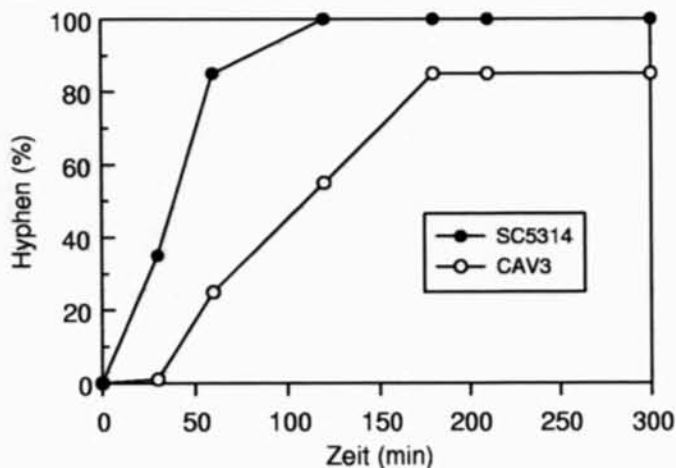
**Abb. 3.22: Transport des fluoreszenten Endocytosemarkers FM4-64 in *C. albicans*.** Zellen der Stämme SC5314 und CAV3 (*vps34/vps34*) aus der logarithmischen Wachstumsphase wurden 30 min bei 28°C mit dem lipophilen Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 inkubiert. Anschließend wurde nach 30 min (obere Reihe), 60 min (mittlere Reihe) und 120 min (untere Reihe) der Transport des Endocytosemarkers in den Zellen fluoreszenzmikroskopisch verfolgt. Die Pfeile kennzeichnen FM4-64-akkumulierende Kompartimente in der *CaVPS34*-Nullmutante. DIC: Differentieller Interferenzkontrast.



nen die Vakuolen der Nullmutante noch immer nur sehr schwach gefärbt. Die FM4-64-akkumulierenden Strukturen traten dagegen noch deutlicher hervor, wobei neben den kleineren im Cytoplasma verteilten punkartigen Strukturen zunehmend besonders große fluoreszierende Kompartimente in der Nähe der Vakuole zu finden waren. Bei diesen bevorzugt an der Peripherie der Vakuole lokalisierten Strukturen handelt es sich möglicherweise in Analogie zu *S. cerevisiae* um prävakuoläre Endosomen (multivesikuläre Körper). Bei einer weiter verlängerten "Chase"-Inkubationszeit erfolgte auch bei der *CaVPS34*-Nullmutante eine leicht zunehmende Anfärbung der Vakuolenmembran, wobei jedoch kein dem Wildtyp vergleichbares Ringfärbungsmuster erreicht wurde. Diese Ergebnisse zeigen, daß durch *CaVPS34* tatsächlich eine Beeinflussung des endocytischen Transports zur Vakuole stattfindet.

### 3.8.9 Einfluß von *CaVPS34* auf die Bildung von Hyphen unter verschiedenen Induktionsbedingungen

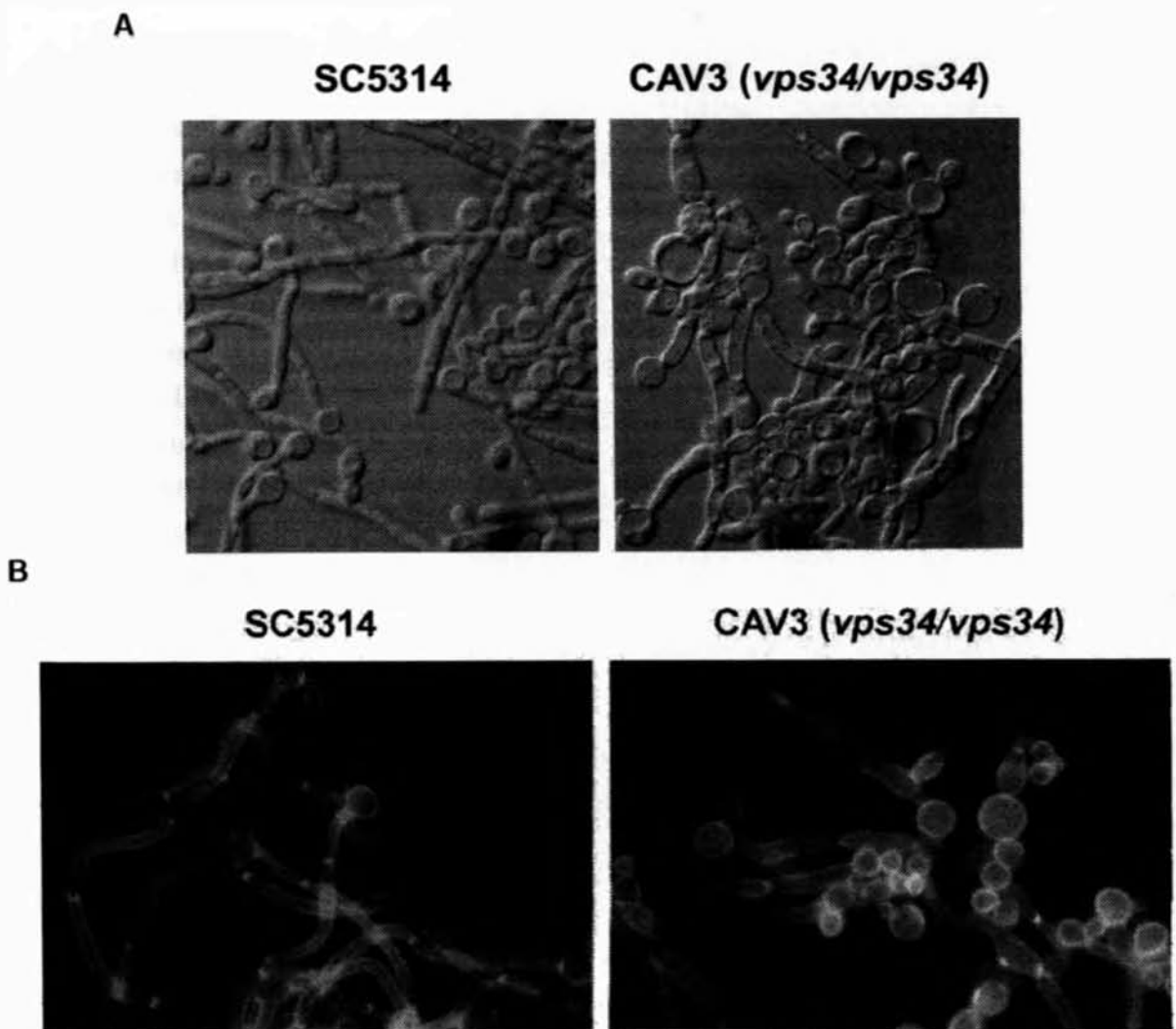
Der Dimorphismus, d.h. die Fähigkeit von *C. albicans*, als einzellige Hefe zu wachsen oder aber Hyphen zu bilden, wird als ein wichtiger Virulenzfaktor angesehen (Cutler *et al.*, 1991). Hinweise aus der ebenfalls dimorph wachsenden Hefe *Y. lipolytica* deuten auf eine Beteiligung von Phosphoinositiden an den morphogenetischen Veränderungen der Hefe-Hyphe-Transition hin (Lopez *et al.*, 1994). Im Abschnitt 3.3 wurde durch Northern-Hybridisierung gezeigt, daß *CaVPS34* nicht hyphenspezifisch reguliert wird. Die Expression des Gens korreliert hingegen unabhängig von der Wachstumsform mit intensivem Wachstum. Da während der Ausbildung von Keimschläuchen sowie bei der Elongation der Hyphen ein intensives Wachstum erfolgt und Vesikeltransportprozesse dabei von großer Bedeutung sind, könnte die PI3-Kinase-Aktivität von *CaVps34p* bei der Hyphenbildung eine wichtige Rolle spielen. Zudem könnten die am morphogenetischen Wechsel vom Sproßzellwachstum zum hyphalen Wachstum beteiligten Signaltransduktionsprozesse



**Abb. 3.23: Hyphenbildung von *C. albicans* in YPD-Medium mit 15% FCS bei 37°C.** Das Diagramm zeigt den Verlauf der Hypheninduktion des *C. albicans* Wildtypstammes SC5314 und der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) in einem repräsentativen Experiment.

einer Beeinflussung durch CaVps34p unterliegen. In diesem Zusammenhang bestand deshalb eine sehr interessante Fragestellung in der Untersuchung der Auswirkung der Disruption von *CaVPS34* auf den Dimorphismus von *C. albicans*.

In einem ersten Experiment erfolgte die Induktion hyphalen Wachstums von *C. albicans* SC5314 und der *CaVPS34*-Nullmutante in flüssigem YPD-Medium mit 15% FCS, da Serum einen sehr effektiven Induktor von Hyphen in *C. albicans* darstellt. Wie bei der Analyse der Expression von *CaVPS34* wurden dazu Zellen aus der späten logarithmischen Wachstumsphase in einer Verdünnung von 1:10 unter Zugabe von FCS in frisches YPD-Medium überführt und unter Schütteln bei 37°C weiterinkubiert. Die Anzahl der dabei gebildeten Hyphen wurde nach verschiedenen Zeiten unter dem Mikroskop bestimmt. Allerdings erschwerte das in der *CaVPS34*-Nullmutante zu beobachtende pseudo-hyphale Wachstum die Auszählung der Keimschläuche. Die in Abbildung 3.23 angegebenen Werte repräsentieren deshalb die Gesamtheit aus echten Hyphen und Pseudohyphen.



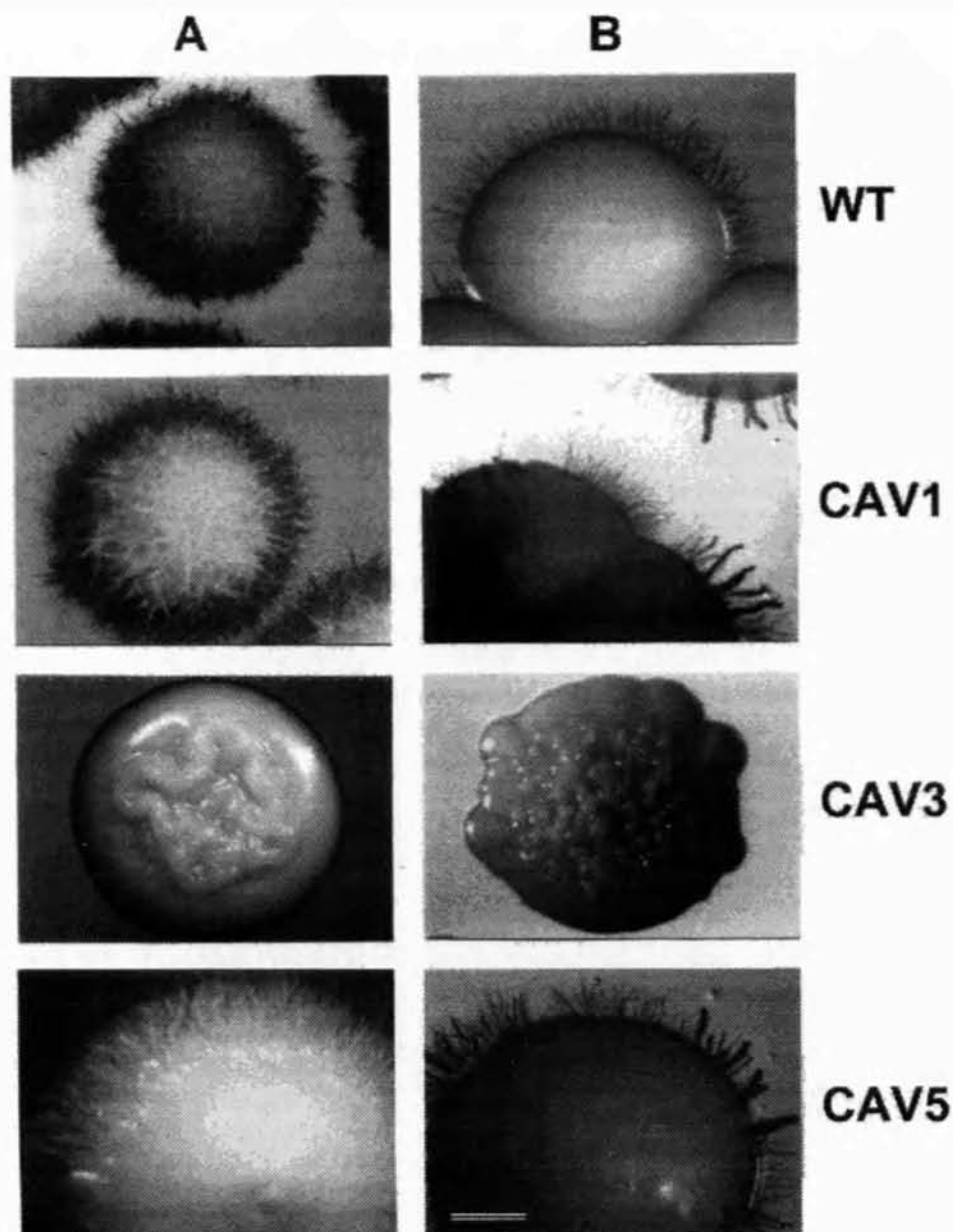
**Abb. 3.24: Morphologie von *C. albicans* nach Hypheninduktion in YPD/FCS-Medium bei 37°C.** A) *C. albicans* SC5314 und CAV3 dargestellt im differentiellen Interferenzkontrast nach 1,5 h Hypheninduktion. B) *C. albicans* SC5314 und CAV3 nach 5 h Hypheninduktion. Die Zellwände wurden mit Calcofluor White angefärbt.

Wie aus dieser Abbildung hervorgeht, war die Bildung von Hyphen in der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) signifikant verzögert, und es wurden außerdem nur etwa 85% Hyphen bzw. Pseudohyphen erreicht. Abbildung 3.24 A zeigt, daß der Wildtypstamm nach 1,5 h Wachstum in FCS-Medium echte lange Hyphen gebildet hat, während die Nullmutante vor allem pseudohyphenartige Zellen zeigte. Darüberhinaus wies die Nullmutante auch nach 5 h Induktion neben echten Hyphen einen gegenüber dem Wildtypstamm erhöhten Anteil an Pseudohyphen auf (Abb. 3.24 B). Diese Ergebnisse zeigen, daß *CaVPS34* unter den getesteten Bedingungen die Hyphenmorphogenese von *C. albicans* beeinflusst.

Im Wirtsorganismus kommt es vor allem nach Anhaftung von *C. albicans* an Oberflächen zur Ausbildung von Hyphen. Die Untersuchung der Hyphenbildung von *C. albicans* auf Agarplatten stellt deshalb ein Modell für die Hypheninduktion dar, bei dem zusätzlich zu Induktionsfaktoren wie Serum, Temperatur oder Nährstoffmangel der Kontakt mit einer festen Oberfläche gegeben ist, auf der der Pilz nach Ausbildung von Hyphen entlangwachsen sowie auch in diese eindringen kann. Um zu überprüfen, ob *CaVPS34* auch unter diesen Bedingungen eine Bedeutung für den Dimorphismus von *C. albicans* besitzt, wurde die Hyphenbildung der *C. albicans*-Stämme SC5314, CAV1, CAV3 und CAV5 auf festen Medien bei variierenden Induktionsbedingungen untersucht.

Zunächst erfolgte die Hypheninduktion auf YPD-Agarplatten, denen 10% FCS zugesetzt worden war. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubation bei 37°C ließen sich bereits beim Betrachten der Platten ohne Hilfsmittel eindeutige Unterschiede in der Koloniemorphologie der einzelnen Stämme feststellen. So zeigten die Kolonien bei einer erfolgten Hyphenbildung einen deutlichen Hyphensaum. Dieser konnte beim Wildtypstamm, bei der Einfach-Disruptante sowie der Einfach-Revertante beobachtet werden. Die von der *CaVPS34*-Nullmutante gebildeten Kolonien waren dagegen glatt bzw. zeigten eine warzige oder leicht gefurchte bis gefältelte Oberfläche. Mit Hilfe des Stereomikroskops konnte die Koloniemorphologie und Filamentbildung der einzelnen Stämme noch eingehender untersucht werden (Abb. 3.25 B). Dabei bestätigte sich, daß es bei der Nullmutante zu keiner Bildung von Hyphen gekommen war. Darüberhinaus konnte auch nach einer verlängerten Inkubation dieses Stammes von bis zu 14 Tagen keine Hyphenbildung nachgewiesen werden. Um zu überprüfen, ob möglicherweise eine sehr schwache Hyphenbildung stattfindet, wurden einzelne Kolonien der Nullmutante vorsichtig von der Platte gespült und untersucht, ob eventuell darunterliegende Hyphen in den Agar gewachsen sind. Dies war jedoch nicht zu beobachten. Außerdem wurden Quetschpräparate von Koloniematerial angefertigt und unter dem Mikroskop analysiert. Dabei zeigte sich, daß neben Blastosporen auch einige wenige Pseudohyphen in den Kolonien enthalten waren (nicht abgebildet). Echte Hyphen wurden dagegen auch hier nicht gefunden.

Die gewonnenen Ergebnisse zeigen, daß das Fehlen beider Kopien von *CaVPS34* bei der Nullmutante dazu führt, daß die Bildung von Hyphen auf YPD/FCS-Platten nicht mehr möglich ist. Die Disruption nur einer Kopie von *CaVPS34* hat dagegen unter den getesteten Bedingungen keinen Einfluß auf die Hyphenbildung von *C. albicans*, und auch die Reintegration einer Kopie des Gens in die Nullmutante ist ausreichend für die Wie-



**Abb. 3.25: Hyphenbildung von *C. albicans* auf festen hypheninduzierenden Medien.** A) "Spider"-Agar mit Mannitol als C-Quelle. B) YPD-Agar mit 10% FCS. WT: SC5314, CAV1: *vps34/VPS34*, CAV3: *vps34/vps34*; CAV5: *vps34/(VPS34)*. Die Stämme wurden für sieben Tage bei 37°C inkubiert. Der Balken entspricht 2,7 mm.

derherstellung des Wildtyp-Phänotyps.

Plattiert man *C. albicans* auf Agarplatten aus, die 10% FCS als einzige Nahrungsquelle enthalten, so bildet die Hefe normalerweise sehr schnell Hyphen, die zur Erschließung von Nährstoffen in die Umgebung auswachsen. Die Stämme SC5314, CAV1, CAV3 und CAV5 wurden analog der Untersuchung des Hyphenwachstums auf YPD/FCS-Platten nun auf 2% Wasseragar mit 10% FCS gebracht und bei 37°C inkubiert. Nach vier Tagen konnten bei den Stämmen SC5314, CAV1 und CAV5 Kolonien beobachtet werden, die eine intensive Hyphenbildung zeigten (nicht abgebildet). Sehr deutlich zeigte sich dabei auch das Hineinwachsen der Filamente in den Agar. Im Gegensatz dazu war die Nullmutante

nicht in der Lage, auf diesen Platten zu wachsen. Demnach kann Serum von einem *CaVPS34*-defizienten Stamm nicht als einzige Nährstoffquelle genutzt werden. Möglicherweise ist es beim Wachstum auf reinem FCS-Agar unbedingt notwendig, Hyphen zu bilden, um die Nährstoffverfügbarkeit zu erhöhen. Dafür spricht die intensive Hyphenbildung der übrigen Stämme. Somit wäre der Wachstumsdefekt der Nullmutante auf Serumagar eine Folge ihrer beeinträchtigten Hyphenbildung. Außerdem ist es aber auch denkbar, daß für die Nutzung der Serumbestandteile als Nahrungsquelle notwendige metabolische Prozesse in der Nullmutante gestört sind.

Eine weitere Möglichkeit der Induktion von Hyphen in *C. albicans* besteht in der Kultivierung auf dem sogenannten "Spider"-Agar (Liu *et al.*, 1994). Dabei sind die durch Nährstofflimitation entstehenden Mangelbedingungen der auslösende Faktor für den Übergang zum hyphalen Wachstum. Abbildung 3.25 A zeigt, daß nach fünf bis sieben Tagen Wachstum bei 37°C auf "Spider"-Platten bei SC5314, CAV1 und CAV5 eine deutliche Hyphenbildung auftrat. Diese wurde an den Kolonierändern als Hyphensaum sichtbar und führte zum Teil sogar zu über die ganze Kolonie verteilt in alle Richtungen auswachsenden Hyphen. Dagegen fand bei der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) wiederum kein morphogenetischer Wechsel zu hyphalem Wachstum statt. Wie bei der Induktion mittels Serum blieben die Kolonien glatt bzw. zeigten eine leicht gefaltete Oberfläche. Auch in Quetschpräparaten wurden neben einem überwiegenden Anteil an Blastosporen lediglich einige wenige Pseudohyphen, nicht aber echte Hyphen gefunden. Somit zeigt die Nullmutante sowohl bei der Hypheninduktion durch den positiven Induktor Serum als auch unter Mangelbedingungen ("Spider") auf festen Medien einen deutlichen Hyphenbildungsdefekt.

Bei der Induktion von Hyphen in flüssigem "Spider"-Medium kam es wie auch bei der Induktion durch FCS in Flüssigkultur zu einer Verzögerung der Hyphenbildung der *CaVPS34*-Nullmutante (Daten nicht gezeigt).

Zusammenfassend kann festgestellt werden, daß *CaVPS34* unter den verschiedenen getesteten Bedingungen für eine normale Bildung von echten Hyphen notwendig ist, da nach dem Ausschalten beider Allele des Gens die Hefe-Hyphe-Transition in flüssigen Medien stark verzögert erfolgt und auf festen Medien mit verschiedenen Induktionsreizen keine Hyphenbildung mehr möglich ist.

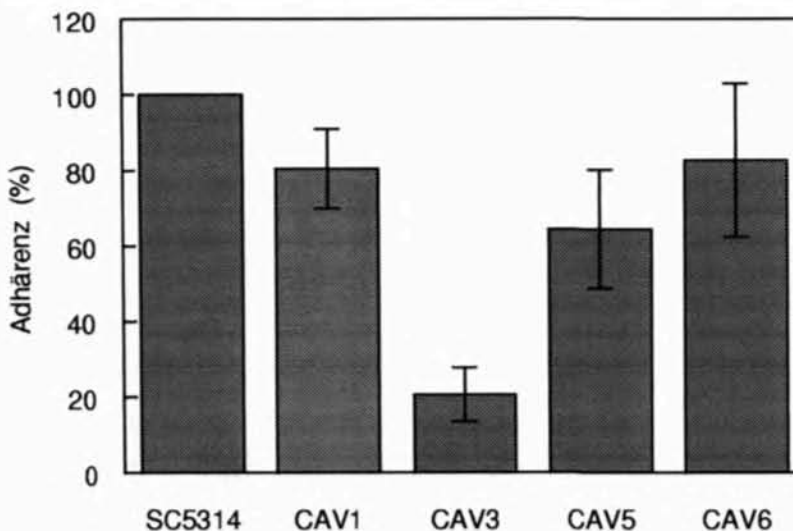
### **3.8.10 Auswirkung der Disruption von *CaVPS34* auf die Adhäsion an Maus-Fibroblastenzellen**

Eine wichtige Voraussetzung für die Pathogenese einer systemischen Candidosis ist die Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen. Dabei wird die Adhäsion an Epithelien und Endothelien als eine der Vorbedingungen für die Penetration von *C. albicans* ins Gewebe und damit für die Ausbreitung der Infektion angesehen. Bisher ist nicht bekannt, ob zwischen dem intrazellulären Vesikeltransport sowie der Vakuolenhomöostase und der Adhäsion von *C. albicans* an andere Zellen ein Zusammenhang besteht. Um diese Frage zu untersuchen, wurden die einzelnen *CaVPS34*-Mutanten- und Revertantenstämme sowie

der Wildtypstamm SC5314 in einem Adhäsionstest nach Borg-von Zepelin *et al.* (1995) verglichen.

Die Ergebnisse von vier separaten Experimenten, wovon jedes mindestens in zwei Parallelen durchgeführt wurde, sind in Abbildung 3.26 zusammengefaßt. Dabei wurde die Adhäsion des Wildtypstammes SC5314 als 100% angesetzt. Die Mutantenstämme CAV1 und CAV3 zeigten im Vergleich dazu eine Adhäsion von  $80\% \pm 10\%$  und  $20\% \pm 7\%$ . Die stark abgeschwächte Adhäsion der Nullmutante (CAV3) an die Maus-Fibroblastenzellen ist hochsignifikant ( $t$ -Test für  $P \leq 0,025$ ) und weist auf eine Rolle von CaVps34p in Zell-Zell-Interaktionen zwischen dem Wirtsorganismus und dem Pathogen hin. Der geringe Unterschied der Adhäsion des einfach *CaVPS34*-disruptierten Stammes CAV1 zu SC5314 ist dagegen nur schwach signifikant. Revertanten, die entweder ein oder beide *CaVPS34*-Allele enthalten, hatten die Fähigkeit wiedergewonnen, nahezu wie die Einfachmutante bzw. der Wildtyp zu adhäreren. Sie zeigten im Test  $64\% \pm 15\%$  (CAV5) sowie  $83\% \pm 20\%$  (CAV6) Adhärenz. Relativ zu SC5314 ist die beobachtete Adhärenzverminderung von CAV5 schwach signifikant. Somit zeigen die beiden jeweils nur eine Kopie von *CaVPS34* enthaltenden Stämme CAV1 und CAV5 eine leichte, aber signifikant veränderte Adhäsionsfähigkeit, deren Ursache möglicherweise ein Gendosiseffekt ist. Zwischen CAV6 und SC5314 besteht dagegen wie erwartet kein signifikanter Unterschied.

Es ist bekannt, daß Hyphen stärker an die Gewebe des Wirtsorganismus adhäreren als Blastosporen. Um festzustellen, welchen Einfluß die verzögerte Hyphenbildung der *CaVPS34*-Nullmutante auf die Ergebnisse der Adhäsionstests ausübt, wurde der Versuch nach verschiedenen Zeiten der Vorinkubation durchgeführt. Es wurde untersucht, ob eine



**Abb. 3.26: Adhäsion von *C. albicans* an Maus-Fibroblasten.** Vergleich der Adhäsion der Stämme SC5314, CAV1:*vps34/VPS34*, CAV3:*vps34/vps34*, CAV5:*vps34/[VPS34]* und CAV6: [*VPS34/VPS34*] an Maus-Fibroblastenzellen L929 mit Hilfe eines Fluoreszenz-Adhärenz-Tests nach Borg-von Zepelin *et al.* (1995). Dargestellt sind die gemittelten Werte aus vier verschiedenen Experimenten einschließlich Standardabweichungen. Als Bezugswert wurde die Adhärenz des Wildtypstammes SC5314 auf 100% gesetzt.

längere Vorinkubation der Nullmutante zu einer stärkeren Adhäsion führt. Dabei zeigte sich jedoch, daß die Adhäsion davon unbeeinflusst blieb. So war der Grad der Adhärenz der Nullmutante an die Fibroblastenzellen bei einer einstündigen oder dreistündigen Vorinkubation gleich, obwohl diese nach 3 h Vorinkubation 80% Hyphen gebildet hatte.

Als eine Variante zur Untersuchung eines eventuellen Einflusses der verringerten Wachstumsgeschwindigkeit der *CaVPS34*-Nullmutante wurde die Koinkubationszeit von Fibroblastenzellen und *C. albicans* Zellen von 2 h auf 4 h erhöht. Auch hier zeigte sich kein Effekt bezüglich der Adhäsion. Es konnte keine Zunahme der Adhärenz der Nullmutante festgestellt werden, so daß davon ausgegangen werden kann, daß die Deletion von *CaVPS34* einen direkten Einfluß auf die Adhäsion von *C. albicans* an Maus-Fibroblastenzellen besitzt.

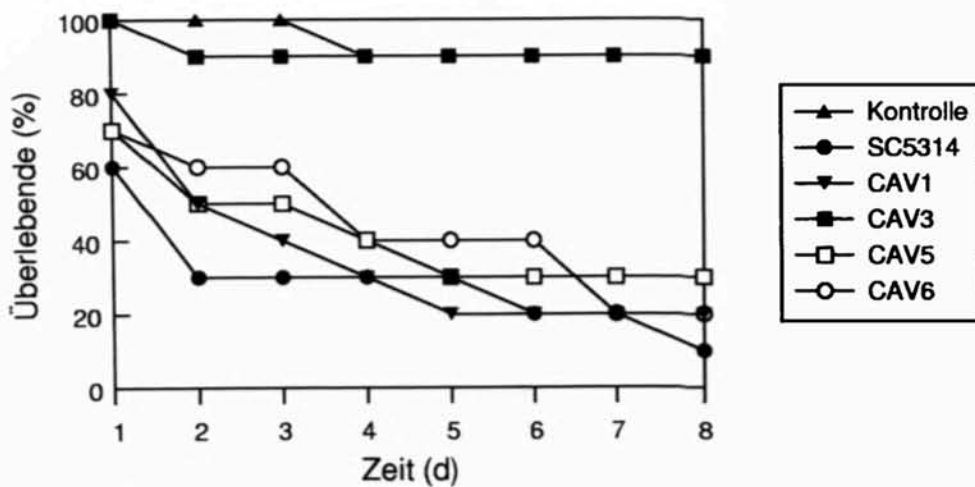
Wichtigstes Ergebnis der durchgeführten Adhäsionstests ist die Beobachtung, daß die Adhäsion der *CaVPS34*-Nullmutante an Maus-Fibroblasten unter den getesteten Bedingungen sehr stark vermindert ist. Daraus ergibt sich eine Bedeutung von *CaVps34p* für Adhäsionsprozesse von *C. albicans*. Da mit der Adhäsion an Fibroblastenzellen ein weiterer wichtiger Virulenzfaktor von *C. albicans* durch *CaVps34p* beeinflusst wird, lag die Vermutung nahe, daß auch im Tiermodell ein entsprechender Einfluß von *CaVps34p* und damit eine verringerte Virulenz der *CaVPS34*-Nullmutante zu beobachten sein würde. Diese Annahme wurde zunächst im alternativen Tiermodell überprüft.

### **3.8.11 Bedeutung von *CaVPS34* für die Virulenz von *C. albicans* im embryonierten Hühnerei-Modell**

Neben den klassischen in der medizinischen Mykologie zur Verfügung stehenden Tiermodellen (Maus, Ratte, Kaninchen, Hamster) stellt das embryonierete Hühnerei eine Alternativmethode zum Nachweis der Virulenz pathogener Pilze wie z.B. *C. albicans* dar (Härtl *et al.*, 1995). Insbesondere durch den Einsatz des Hühnereimodells in Vorversuchen kann der Umfang der notwendigen Pathogenitätstests an Labornagetieren unter Umständen stark reduziert werden. Bei einer nicht oder nur minimal verringerten Virulenz der *CaVPS34*-Nullmutante in diesem Modell entfiel die Notwendigkeit von weiteren Tierversuchen an Laborsäugern.

Der Virulenztest am embryonierten Hühnerei (Abb. 3.27) zeigte, daß die Virulenz der *CaVPS34*-Nullmutante (CAV3) gegenüber dem Wildtypstamm SC5314 deutlich vermindert ist. Nach acht Tagen lebten noch 90% der mit  $1 \times 10^7$  CAV3-Keimen beimpften Hühnerembryonen, während in der Kontrollgruppe des Wildtypstammes noch lediglich 10% am Leben waren. Scheinbehandelte Embryonen zeigten nach dieser Zeit ebenfalls eine Überlebensrate von 90%. Eine Infektion mit den Stämmen CAV1, CAV5 oder CAV6 führte ähnlich wie SC5314 innerhalb von acht Tagen zum Absterben der meisten Embryonen. Dabei lagen die Überlebensraten der Embryonen mit 20% (CAV1, CAV6) bzw. 30% (CAV5) zwar etwas höher, können jedoch aufgrund der üblichen Schwankungen dieses Tiermodellexperimentes mit der Wildtyp-Parallele verglichen werden.





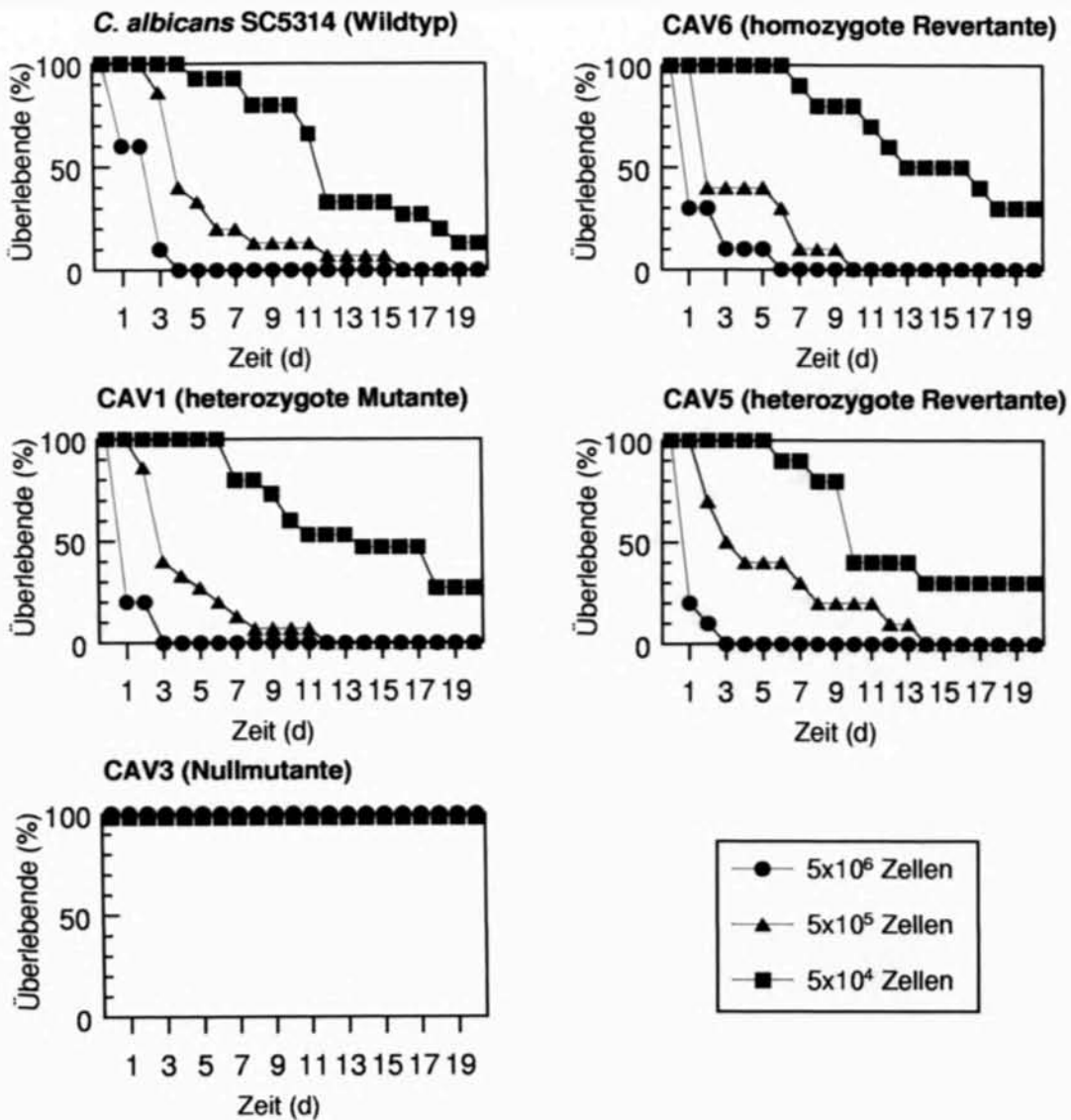
**Abb. 3.27: Virulenz von *C. albicans* im embryonierten Hühnerei.** Es wurden zehn Tage alte bebrütete Hühnereier mit  $10^7$  Keimen injiziert. Danach wurde weiter bebrütet und täglich das Überleben der Embryonen kontrolliert. Gezeigt sind die Ergebnisse aus zwei separaten Versuchen mit je fünf Eiern pro Stamm. Zur Kontrolle wurden je fünf Eier scheinbehandelt. SC5314: Wildtypstamm, CAV1: *vps34/VPS34*, CAV3: *vps34/vps34*, CAV5: *vps34/[VPS34]*, CAV6: *[VPS34/VPS34]*.

Die dargestellten Ergebnisse zeigen, daß *CaVPS34* einen starken Einfluß auf die Virulenz von *C. albicans* im Modell des embryonierten Hühnereis ausübt. Ausgehend von diesem interessanten Befund wurde vermutet, daß die Nullmutante auch im Mausmodell einer systemischen Candidosis eine deutlich verminderte Pathogenität aufweist.

### 3.8.12 Bedeutung von *CaVPS34* für die Virulenz von *C. albicans* im Mausmodell einer systemischen Candidosis

Die Pathogenität von *C. albicans*-Stämmen kann in verschiedenen Tiermodellen überprüft werden. Neben oralen und vaginalen Infektionen werden auf diese Weise vor allem systemische Infektionen durch *C. albicans* modellhaft untersucht. Ein sehr häufig benutztes und allgemein anerkanntes Modell ist das Mausmodell einer systemischen Infektion. Ein solches Mausmodell, bei dem die Infektion mit *C. albicans* über die laterale Schwanzvene erfolgt, stand in der Abteilung Wirkstoffprüfung des HKI zur Verfügung. Da im alternativen Tiermodell bereits eine signifikant verringerte Virulenz der *CaVPS34*-Nullmutante beobachtet worden war, sollte überprüft werden, ob dieser Effekt auch im Mausmodell einer systemischen Candidosis bestätigt werden kann. Dazu wurden sechs Wochen alte immunkompetente Mäuse mit verschiedenen Konzentrationen von *C. albicans* SC5314, CAV1, CAV3, CAV5 und CAV6 infiziert und über einen Zeitraum von 20 Tagen beobachtet. Die Ergebnisse von drei unabhängigen Versuchen sind in Abbildung 3.28 dokumentiert. Nach Applikation der höchsten Keimzahl ( $5 \times 10^6$ ) des Wildtypstammes erfolgte ein sehr rasches Absterben der Tiere, so daß nach vier Tagen alle Mäuse gestorben waren. Das ist sehr wahrscheinlich auf eine durch *C. albicans* ausgelöste Sepsis zurückzuführen. Die mittlere Keimzahl ( $5 \times 10^5$ ) ließ die Überlebensrate nach sechs Tagen auf 20% absinken, ein Effekt, der ebenfalls der Sepsis zuzuordnen ist. Die niedrig-





**Abb. 3.28: Virulenz von *C. albicans* im Maus-Candidosis-Modell.** Vergleich der Stämme SC5314: Wildtypstamm, CAV1: *vps34/VPS34*, CAV3: *vps34/vps34*, CAV5: *vps34/[VPS34]*, CAV6: *[VPS34/VPS34]*. Die Mäuse wurden mit  $5 \times 10^6$ ,  $5 \times 10^5$  oder  $5 \times 10^4$  Keimen durch Applikation in die laterale Schwanzvene infiziert. SC5314 n=15, außer  $5 \times 10^6$ : n=10; CAV1, CAV6: n=10; CAV3: n=15.

ste Keimzahl ( $5 \times 10^4$ ) erzeugte hingegen einen langsameren Krankheitsverlauf. Hier war die Überlebensrate nach 12 Tagen auf 35% abgesunken. Als Ursache dieses Verlaufes ist eine fortschreitende systemische Infektion mit anschließendem Organversagen anzusehen. Bei Abschluß des Versuches nach 20 Tagen betrug die Überlebensrate 15%. Die Infektion der Mäuse mit den entsprechenden Keinkonzentrationen des heterozygot *CaVPS34*-disruptierten Stammes CAV1 zeigte einen vergleichbaren Krankheitsverlauf. Es wurde keine signifikante Veränderung der Virulenz festgestellt (*log-rank-Test*,  $P \leq 0,05$ ). Nach Applikation der *CaVPS34*-Nullmutante konnte in allen drei Keimkonzentrationen keinerlei Krankheitsbild bei den Mäusen beobachtet werden. Die jeweiligen Überlebensraten betrugen auch nach 20 Tagen 100%. Damit wurde deutlich gezeigt, daß die *CaVPS34*-Nullmutante im Maus-Candidosis-Modell avirulent ist. In den Stämmen mit einem bzw.

zwei reintegrierten *CaVPS34*-Allelen (CAV5, CAV6) war relativ zum Wildtypstamm wie erwartet die volle Virulenz von *C. albicans* wiederhergestellt. Die Unterschiede der Überlebensraten der mit diesen *C. albicans*-Stämmen infizierten Tiere sind im Vergleich zu SC5314 und der heterozygoten Mutante (CAV1) nicht signifikant ( $P \leq 0,05$ ).

Bei systemischen Infektionen kommt es sehr häufig zu einer Nierencandidosis sowie zu einer Kolonisierung weiterer innerer Organe wie Lunge, Leber und Milz. *C. albicans* zeigt in Tiermodellen disseminierter Infektionen eine bevorzugte Besiedlung der Nieren, in deren Folge es zum Absterben der betroffenen Tiere kommt (Odds, 1988). Gegenwärtigen Vorstellungen zufolge sind insbesondere für die Besiedlung von Organen durch das Eindringen in tieferliegende Gewebsschichten Adhäsion und Hyphenbildung von *C. albicans* notwendige Voraussetzungen. Die Untersuchungen zur Hyphenbildung und zur Adhäsion der *CaVPS34*-Nullmutante an Maus-Fibroblastenzellen haben gezeigt, daß diese unter den getesteten Bedingungen eine starke Beeinträchtigung zweier für eine systemische Infektion wichtigen Virulenzeigenschaften aufweist (vgl. 3.8.9, 3.8.10). Es wurde daher erwartet, daß sich diese Effekte auch bei den Untersuchungen im Mausmodell widerspiegeln. Um festzustellen, ob die *CaVPS34*-Nullmutante zur Nierenbesiedlung in der Lage ist, wurde die *Candida*-Kolonisierung in den Nieren nach 20 Tagen analysiert. Die zu diesem Zeitpunkt überlebenden Mäuse wurden abgetötet und auf die Belastung ihrer Nieren mit *C. albicans* untersucht. Von den mit der Nullmutante infizierten Tieren wurden je drei Mäuse pro Keimzahl und Versuch ausgewählt und entsprechend getestet. Vergleichend erfolgte die Untersuchung der mit dem Wildtypstamm SC5314 bzw. der heterozygoten Mutante (CAV1) infizierten Tiere. Während die Nieren der mit SC5314 oder CAV1 infizierten Tiere sehr hohe Keimlasten von  $1,2\text{--}2,3 \times 10^6$  CFU/g (‘‘colony forming units’’ pro Gramm Nierengewebe) aufwiesen, konnte bei den mit der Nullmutante infizierten Mäusen keinerlei Besiedlung der Nieren mit *C. albicans* festgestellt werden. In einem der Experimente wurden außerdem Leber und Milz der Mäuse auf *C. albicans*-Befall untersucht. Auch in diesen Organen konnte die *CaVPS34*-Nullmutante nicht nachgewiesen werden.

Parallel zu den bereits beschriebenen Virulenzversuchen wurden je drei Mäuse mit dem Wildtypstamm SC5314, der Einfachmutante und der Nullmutante mit der Keimzahl von  $5 \times 10^5$  Zellen inokuliert und nach drei Tagen abgetötet, um die Nieren zu untersuchen. Dabei wurden mit den Stämmen SC5314 und CAV3 drei unabhängige Versuche vorgenommen. Die Einfachmutante CAV1 wurde nur in zwei Versuchen untersucht. Von den neun mit dem Wildtypstamm infizierten Mäusen waren am dritten Tag bereits vier Tiere gestorben und konnten nicht mehr untersucht werden. Von den sechs CAV1-infizierten Tieren überlebten vier Tiere bis zur Untersuchung. Einzig die mit der *CaVPS34*-Nullmutante infizierten Mäuse zeigten keinerlei Krankheitsanzeichen und konnten alle für die Untersuchung verwendet werden. Am höchsten war die *Candida*-Keimzahl mit  $2,0\text{--}6,2 \times 10^4$  CFU/g in den Nieren der Tiere, welche den Wildstamm appliziert bekommen hatten. Die Keimzahl in den Nieren der mit der Einfachmutante inokulierten Mäuse betrug hingegen nur  $0,4\text{--}3,1 \times 10^4$  CFU/g. Die Besiedlung der Nieren durch *C. albicans*-Zellen, denen eine Kopie von *CaVPS34* fehlt, erfolgte also bei einigen Tieren langsamer. Statistisch hatte dies

jedoch keinen Einfluß auf den Krankheitsverlauf im Infektionsversuch (siehe oben). In den Nieren der Mäuse, denen die Nullmutante appliziert worden war, konnte nach drei Tagen keine Besiedlung mit *C. albicans* nachgewiesen werden. Da auch die Mäuse nach Abschluß des 20 Tage andauernden Infektionsversuches keinerlei *C. albicans*-Besiedlung der Nieren aufwiesen, konnte gezeigt werden, daß *CaVPS34* für die Besiedlung der Nieren mit *C. albicans* und die Virulenz von *C. albicans* im Mausmodell einer systemischen Infektion essentiell ist.

Untersuchungen von Lay et al. (1998) haben ergeben, daß die Verwendung von *URA3* als selektierbarer Disruptionsmarker bei der Erzeugung von Mutanten mit Problemen bei Pathogenitätsuntersuchungen solcher Mutanten verbunden sein kann. Danach könnten Mutantenstämme aufgrunddessen, daß sie nur eine Kopie des *URA3*-Gens enthalten, bereits eine geringere Virulenz aufweisen als der Wildtypstamm.

Durch die Reintegration von *CaVPS34* in die *CaVPS34*-Nullmutante konnte der Einfluß dieses Effekts im konkreten Fall ausgeschlossen werden, da das Gen danach wieder in einem bzw. beiden Allelen vorliegt, der *URA3*-Status der Revertanten dagegen jedoch derselbe wie der der Nullmutante ist. Insbesondere der Vergleich des Stammes CAV6 (*VPS34/VPS34-URA3*) mit dem Wildtypstamm SC5314 zeigt, daß das Vorhandensein nur einer Kopie des *URA3*-Gens keinen signifikanten Einfluß auf die Virulenz der getesteten Stämme ausübt (Abb. 3.28).

### 3.9 Identifizierung einer zu *TOR1/TOR2* aus *S. cerevisiae* homologen Sequenz in *C. albicans*

Neben der Charakterisierung der PI3-Kinase *CaVPS34* bestand ein weiteres Ziel dieser Arbeit in der Identifizierung weiterer PI3-Kinase-verwandter Proteine in *C. albicans* mit Hilfe eines PCR-Homologieansatzes. Homologievergleiche der Aminosäuresequenzen der Proteine p110 (Mensch), Tor2p (*S. cerevisiae*), Vps34p (*S. cerevisiae*) führten zur Ableitung von Primern aus konservierten Abschnitten (Abb. 3.29). Dabei wurde die spezifische Codon-Nutzung von *C. albicans* berücksichtigt. Die gewählten Primer wurden genutzt, um

			***				***		
pCaTor	9		NLVMQLFGLVNTLLV	(88)			DLYKVLWLKS		121
ScTor2	2130	GHEDIRQDS	LVMQLFGLVNTLLQ	(87)			DLYKILWLKS	(25)	ILGLGDRH 2282
humpl10	804	NGDDLRLQD	MLTLQIIRIMENIQ	(54)			WLKD	(25)	ILGIGDRH 917
ScVps34	626	VGDDLRLQD	QLVVIISLMNELLK	(77)					ILGVGDRH 733
CaVps34	715	IGDDLRLQD	QLVIQIIDLMDQLLK	(133)					ILGVGDRH 878

Abb. 3.29: Alignment der Aminosäuresequenzen der Kinasedomänen von ScTor2 (*S. cerevisiae*); p110α (Mensch); ScVps34 (*S. cerevisiae*), CaVps34 (*C. albicans*) und der abgeleiteten Aminosäuresequenz des PCR-Produktes von *C. albicans*. Aminosäuren, die in mindestens einer weiteren Kinasedomäne konserviert sind, sind fettgedruckt. Mit einem Sternchen sind Aminosäuren gekennzeichnet, die in mindestens zwei weiteren Kinasedomänen konserviert sind. Die beiden PI-Kinase-spezifischen Primer wurden von den kursiv gedruckten Sequenzen abgeleitet.

G	H	E	D	I	R	Q	D	N	L	V	M	Q	L	F	G	L	V	N
GGT	CAT	GAA	GAT	ATT	AGA	CAA	GAT	AAC	TTA	GTG	ATG	CAA	TTG	TTT	GGT	TTG	GTT	AAT
T	L	L	V	N	D	P	E	C	F	K	R	H	L	D	I	Q	Q	Y
ACG	TTG	TTG	GTA	AAT	GAT	CCG	GAA	TGT	TTC	AAG	AGA	CAT	TTG	GAT	ATA	CAA	CAA	TAT
A	P	I	P	L	S	P	K	V	G	L	L	G	W	V	P	N	S	D
CCT	GCT	ATT	CCA	TTA	TCA	CCA	AAA	GTG	GGA	TTG	CTT	GGT	TGG	GTT	CCA	AAT	AGT	GAC
T	F	H	V	L	I	K	G	Y	R	E	S	R	S	I	M	L	N	I
ACT	TTC	CAT	GTA	TTG	AAC	AAA	GGC	TAT	CGC	GAA	TCA	AGA	AGT	ATA	ATG	TTG	AAT	ATT
E	H	R	R	L	L	L	Q	M	A	P	D	Y	D	F	L	T	L	L
GAA	CAC	AGG	CTT	TTG	TTG	CAA	ATG	GCA	CCT	GAT	TAT	GAT	TTC	TTG	ACA	TTA	TTG	CAA
Q	K	V	E	V	F	T	S	A	M	D	N	C	K	G	Q	D	L	Y
AAA	GTT	GAA	GTG	TTC	ACA	AGT	GCA	ATG	GAT	AAT	TGT	AAG	GGA	CAG	GAT	TTG	TAC	AAA
K	V	L	W	L	K	S												
GTG	TTA	TGG	CTC	AAA	TCA	TCA												

**Abb. 3.30: Nukleotid-und Aminosäuresequenz der isolierten 363 bp-Gensonde für *CaTOR*.**

in einer PCR-Reaktion mit chromosomaler DNA von *C. albicans* SC5314 DNA-Fragmente mit Homologie zu weiteren PI-Kinasen zu amplifizieren.

Mit Hilfe der Primer PK2P und AB9 (vgl. 2.2.1) wurde ein 387 bp-Fragment amplifiziert, direkt in den Vektor pCR-Script™ Amp SK(+) kloniert und sequenziert (Abb. 3.30). Das klonierte Fragment (363 bp) war im Vergleich zu dem PCR-Produkt um den Primer PK2P verkürzt. Im Homologievergleich mit Hilfe des BLAST Search Algorithmus (Altschul *et al.*, 1990) zeigte dieses Fragment die höchste Sequenzidentität zu Tor2p (81%) und Tor1p (80%) aus *S. cerevisiae*. Damit war die Existenz einer zu *S. cerevisiae* TOR1/TOR2 hochhomologen Sequenz in *C. albicans* nachgewiesen. Die identifizierte *CaTOR*-Sequenz wurde im Rahmen der Diplomarbeit von S. Gröbl als Sonde bei der Klonierung eines ORF's mit mit Homologie zu *ScTOR1/ScTOR2* aus einer *C. albicans* Fosmid-Genbank genutzt. Das putative Genprodukt des aus *C. albicans* klonierten Gens *CaTOR* ist 59% homolog zu *ScTor1p* und 60% homolog zu *ScTor2p*. *CaTorp* zeigt Homologie zu allen PI-Kinasen bzw. PI-Kinase-verwandten Proteinen, da es die charakteristische Lipidkinasedomäne aufweist. Die Homologie zu Tor1p/Tor2p beträgt innerhalb dieser PI-Kinasedomäne mehr als 90%.

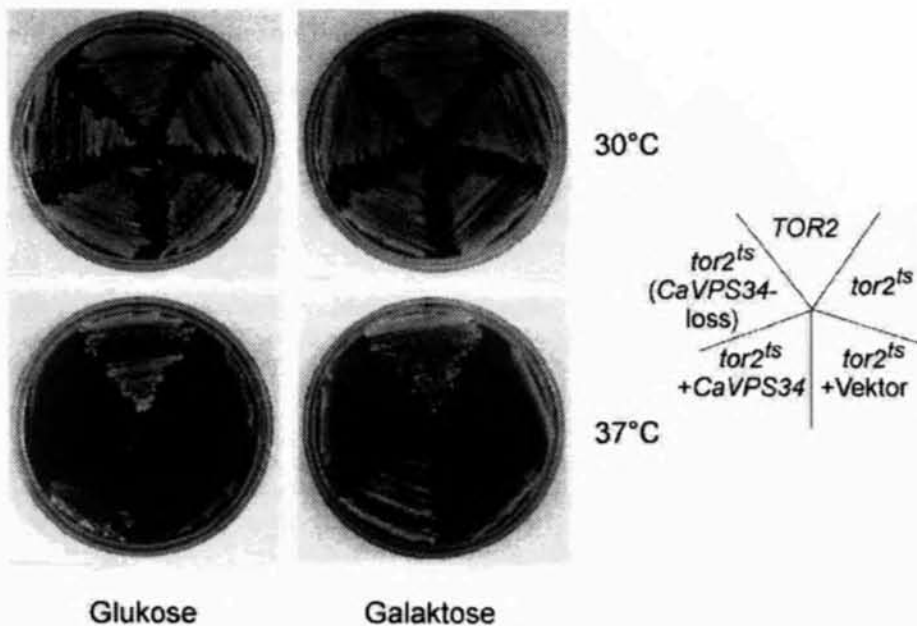
Parallel zu dieser Arbeit wurde auch im Rahmen des *C. albicans*-Genom-Sequenzierungsprojektes der Stanford-University (<http://alces.med.umn.edu:80/bin/genelist?seqs>) die Existenz eines TOR1/TOR2-Homologen nachgewiesen. Die dabei gefundenen Teilsequenzen sind jedoch nicht mit der in der vorliegenden Arbeit isolierten Teilsequenz identisch und weisen keine Überlappung auf.

### 3.10 Suppression des Wachstumsdefektes einer *S. cerevisiae* *tor2<sup>ts</sup>*-Mutante durch Überexpression von *CaVPS34*

Ausgangspunkt der folgenden Untersuchungen war die Frage, ob zwischen *CaVPS34* und *CaTOR* ein funktioneller Zusammenhang existiert. Die Durchführung von Suppressionsversuchen mit *S. cerevisiae* *tor*-Mutanten bei Überexpression von *CaVPS34* sollte dazu einen ersten Anhaltspunkt liefern. Es standen dabei drei verschiedene temperatursensitive *tor*-Mutanten zur Verfügung: *tor2-21<sup>ts</sup>*, *tor1 tor2-21<sup>ts</sup>* und *tor1 tor2-29<sup>ts</sup>*. Diese entstam-

men einem Mutantenscreen von temperatursensitiven *tor*-Mutanten und gehören verschiedenen Klassen an (Helliwell *et al.*, 1998). Der Stamm SH121 (*tor2-21<sup>ts</sup>*) gehört zur Klasse A der *tor*-Mutanten, welche einen *ts*-Phänotyp bezüglich *tor2*-spezifischer Funktionen aufweisen (Helliwell *et al.*, 1998). Mutanten dieser Klasse zeigen Defekte in der Polarisierung des Aktinzytoskeletts und stellen nach zwei bis drei Generationen als kleinknoselige Zellen in der G2/M-Phase des Zellzyklus ihr Wachstum ein. Der Stammhintergrund der Klasse A Mutanten unterscheidet sich von dem der Klassen B und C darin, daß erstere ein funktionelles *TOR1*-Gen besitzen, während in letzteren *TOR1* deletiert ist. SH229 (*tor1 tor2-29<sup>ts</sup>*) ist temperatursensitiv hinsichtlich der gemeinsamen Funktion von Tor1p und Tor2p und wird deshalb in die Klasse B eingeordnet. Die überlappende Funktion von Tor1p und Tor2p besteht in der Kontrolle der Proteinbiosynthese und der Zellzyklusprogression. Diese Mutanten arretieren bereits in der ersten Generation in der G1-Phase. Der Stamm SH221 (*tor1 tor2-21<sup>ts</sup>*) hingegen ist für beide Tor2-Funktionen temperatursensitiv und fällt damit in die Klasse C (Helliwell *et al.*, 1998).

Die oben aufgeführten Mutantenstämme wurden mit dem in Abschnitt 3.6.2 beschriebenen Plasmid pYGAB1 transformiert, welches *CaVPS34* unter der Kontrolle des *S. cerevisiae* *GAL1*-Promotors enthält. Bei der Selektion von Transformanten und bei der Durchführung der Plasmidverlust-Experimente wurde ebenfalls wie in Abschnitt 3.6.2 angegeben verfahren. In den Komplementationsuntersuchungen mit den verschiedenen



**Abb. 3.31: Suppression des Wachstumsdefektes einer *S. cerevisiae* *tor2<sup>ts</sup>*-Mutante durch Überexpression von *CaVPS34*.** Folgende *S. cerevisiae*-Stämme wurden vergleichend untersucht: die untransformierte *tor2<sup>ts</sup>*-Mutante SH121 [*tor2<sup>ts</sup>*] (Helliwell *et al.*, 1998), SH121 nach Transformation mit dem Vektor pYES2G [*tor2<sup>ts</sup>*+pYES2G], SH121 nach Transformation mit dem *CaVPS34*-enthaltenden Plasmid pYGAB1 [*tor2<sup>ts</sup>*+pYGAB1], SH121 nach Verlust des vormals enthaltenen Plasmides pYGAB1 [*tor2<sup>ts</sup>* (pYGAB1-loss)], sowie der Elternstamm SH100 [*TOR2*] (Helliwell *et al.*, 1998). Das Wachstum dieser Stämme wurde nach vier Tagen Inkubation bei 30°C (permissive Temperatur) bzw. 37°C (nicht-permissive Temperatur) auf Selektivagar mit 2% Glukose bzw. 4% Galaktose untersucht.

*tor*-Mutanten konnte als Vergleichsstamm der jeweils zugehörige Mutterstamm (SH100, SH200) mitgeführt werden. Der Stamm SH100 ist isogenisch zu SH121, während SH200 zu SH221 und SH229 isogenisch ist. Dem in Abbildung 3.31 dokumentierten Komplementationsversuch kann man entnehmen, daß die Überexpression von *CaVPS34* im Stamm SH121 (*tor2-21<sup>ts</sup>*) zur Suppression des temperatursensitiven Wachstumsdefekts dieser Mutante führte. Deutlich wird außerdem, daß nach Verlust des Plasmides pYGAB1 auch der Suppressionseffekt verschwindet. Da die Transformation von SH121 mit dem leeren Vektor pYES2G ebenfalls keinen Einfluß auf den Wachstum der Mutante hat, kann von einer *CaVPS34*-spezifischen Suppression des Wachstumsdefekts der *tor2-21<sup>ts</sup>*-Mutante ausgegangen werden. In den Stämmen SH221 (*tor1 tor2-21<sup>ts</sup>*) und SH229 (*tor1 tor2-29<sup>ts</sup>*) kam es dagegen nicht zu einer Suppression des Wachstumsdefekts durch *CaVPS34* (nicht abgebildet). Durch Plasmid-Rescue-Experimente (vgl. 3.6.1) wurde jedoch nachgewiesen, daß auch in diesen Stämmen intakte pYGAB1-Kopien vorliegen.

Zusammenfassend zeigen die durchgeführten Experimente, daß *CaVPS34* den *TOR2*-spezifischen Wachstumsdefekt einer *S. cerevisiae tor2<sup>ts</sup>*-Mutante komplementieren kann. Diese *TOR2*-spezifische Funktion besteht in der Zellzyklus-abhängigen Regulation des Aktinzytoskeletts (Schmidt *et al.*, 1996). *CaVPS34* kann jedoch nicht den Wachstumsdefekt der *tor1 tor2<sup>ts</sup>*-Mutanten komplementieren, der auf der gemeinsamen Funktion von *TOR1* und *TOR2* bei der Kontrolle des Zellzyklus beruht. Somit konnte eine Verbindung von *CaVPS34* zum *TOR2*-spezifischen Signaltransduktionsweg der polarisierten Aktinzytoskelettorganisation aufgezeigt werden.



## 4. Diskussion

*Candida albicans* gilt als der bedeutendste Erreger mukokutaner, insbesondere aber tief lokalisierter Mykosen des Menschen. In den letzten Jahren haben vor allem systemische *Candida*-Infektionen erheblich zugenommen und sind zu einem ernsthaften Problem bei einer steigenden Zahl von Patienten mit schweren Grunderkrankungen bzw. einem geschwächten Immunsystem geworden. Demgegenüber sind die zur Behandlung solcher Mykosen zur Verfügung stehenden therapeutischen Möglichkeiten bisher auf wenige wirksame Medikamente beschränkt. Es besteht deshalb ein großes Interesse an der Entwicklung neuer Antimykotika, wobei ein Ansatzpunkt dazu die Identifizierung neuer Targets für antifungale Wirkstoffe ist. In diesem Zusammenhang werden immer öfter Virulenzmechanismen, die von großer Bedeutung für die Pathogenese einer Candidosis sind, als potentielle Angriffspunkte von Antimykotika diskutiert (Perfect *et al.*, 1996). Um solche Virulenz-assoziierte Targets aufzudecken, gibt es intensive Anstrengungen, die molekularen und funktionellen Zusammenhänge der Virulenzeigenschaften von *C. albicans* grundlegend zu untersuchen.

Mit der vorliegenden Arbeit sollte ein Beitrag dazu geleistet werden, die Bedeutung des intrazellulären Vesikeltransports zur Vakuole und des an seiner Signaltransduktion beteiligten Phosphoinositidmetabolismus für die Pathogenität von *C. albicans* aufzudecken. Gegenstand dieser Arbeit ist die eingehende Charakterisierung der Phosphatidylinositol3-Kinase CaVPS34 aus *C. albicans*. Dabei wurden molekulare, biochemische und funktionelle Aspekte analysiert. Um mögliche Zusammenhänge der Funktion von CaVps34p mit Virulenzeigenschaften erkennen zu können, wurde der Einfluß der PI3-Kinase CaVps34p auf den Dimorphismus, die Adhärenz sowie auf die Pathogenität von *C. albicans* im Tiermodell untersucht.

### 4.1 CaVps34p ist eine funktionelle PI3-Kinase

CaVps34p zeigt 47% Identität zu Vps34p aus *S. cerevisiae*, wenn man die Proteine über die gesamte Aminosäuresequenz vergleicht. In der C-terminalen Region von CaVps34p beträgt aufgrund der dort lokalisierten konservierten Domänen die Homologie zu ScVps34p 65%. Diese starke Konserviertheit der Lipidkinasedomäne ließ erwarten, daß CaVps34p PI3-Kinase-Aktivität besitzt.

#### 4.1.1 Funktionelle Homologie von CaVps34p und ScVps34p

Durch Komplementationsanalysen wurde untersucht, ob CaVps34p die Funktion von *S. cerevisiae* Vps34p ersetzen kann und demzufolge eine *in vivo* funktionelle PI3-Kinase ist (Abschnitte 3.6.1, 3.6.2). Eine Expression von CaVPS34 unter der Kontrolle des eigenen Promoters konnte dabei kein Wachstum des *vps34*-disruptierten *S. cerevisiae*-Stammes

bei 37°C vermitteln. Möglicherweise ist die Expressionsstärke des *C. albicans*-Homologen zu gering für eine Komplementation. Das kann z.B. durch die geringe Kopienzahl des verwendeten Vektors bedingt sein. Ein Grund hierfür könnte außerdem eine fehlende oder ineffiziente Erkennung des *C. albicans*-Promotors in *S. cerevisiae* sein. Möglicherweise sind aber auch für die Regulation der Expression von *CaVPS34* neben den klonierten 510 bp noch weiter stromaufwärts gelegene Promotersequenzelemente notwendig. Hierzu liegen jedoch derzeit noch keine Erkenntnisse vor. Eine andere Ursache könnte in der vergleichsweise geringen Sequenzhomologie beider Proteine in der N-terminalen Region gesehen werden (vgl. Abschnitt 1.3.2). Da in der N-terminalen Region von Vps34p Ligandbindungsstellen sowie regulatorische Untereinheiten für die Interaktion mit anderen Proteinen wie z.B. Vps15p vermutet werden, könnte *CaVps34p* beispielsweise nicht effizient genug mit dem Adaptor- und Aktivatorprotein Vps15p aus *S. cerevisiae* interagieren und demzufolge nicht ausreichend aktiviert werden. In Komplementationsexperimenten mit *VPS34* aus *A. thaliana* (Welters *et al.*, 1994) war beobachtet worden, daß während die gesamte kodierende Sequenz nicht in der Lage war, *S. cerevisiae vps34* zu komplementieren, ein Chimärenprotein aus dem N-terminalen Teil des Hefeproteins und dem C-terminalen Teil des Pflanzenproteins normales Wachstum und die Wildtypmorphologie wiederherstellen konnte.

In einem weiteren Komplementationsexperiment wurde *CaVPS34* unter der Kontrolle des regulierbaren *S. cerevisiae GAL1*-Promotors auf einem "high-copy"-Plasmid in der *S. cerevisiae vps34*-Mutante exprimiert. Die dabei erreichte Expressionsstärke von *C. albicans VPS34* ermöglichte das Wachstum des Mutantenstammes bei 37°C sowie auf Galaktose (Abb. 3.11). Dieses Resultat zeigt, daß *CaVPS34* bei Überexpression *S. cerevisiae VPS34* bezüglich der untersuchten phänotypischen Eigenschaften funktionell ersetzen kann. Die PI3-Kinasen *CaVPS34* und *ScVPS34* weisen demnach nicht nur eine Sequenzhomologie, sondern auch funktionelle Übereinstimmungen auf. Dies kann als ein Hinweis darauf angesehen werden, daß die Rolle von *VPS34* bei der Signaltransduktion des intrazellulären Vesikeltransportes vom Golgi zur Vakuole in *C. albicans* konserviert ist.

Die Serin/Threonin-Proteinkinase Vps15p ist in *S. cerevisiae* das Adapterprotein, welches Vps34p an spezifischen Membranabschnitten lokalisiert und seine Aktivierung bewirkt (Stack *et al.*, 1993). Eine *vps15*-Mutante zeigt deshalb wie eine *vps34*-Mutante einen temperatursensitiven Wachstumsdefekt (Herman *et al.*, 1991). Beiden Mutanten ist außerdem der Verlust der Fähigkeit zum Wachstum auf Galaktose gemeinsam. Durch die Überexpression von *CaVPS34* in einem *vps15*-defizienten *S. cerevisiae*-Stamm konnten die Wachstumsdefekte dieser Mutante bei 37°C sowie auf Galaktose supprimiert werden (Abb. 3.12). Vermutlich ist mit der Überexpression von *CaVPS34* zusätzlich zu der vorhandenen basalen Expression von *ScVPS34* der PI3-Kinase-Gehalt der Zellen insgesamt so groß, daß eine Membranlokalisierung und Aktivierung einer ausreichenden Menge PI3-Kinase auch ohne die Aktivität der Proteinkinase Vps15p möglich ist. Somit wurde ein zusätzlicher Hinweis auf die Beteiligung von *CaVps34p* an intrazellulären Vesikeltransportprozessen



gewonnen. Da außerdem die Existenz eines *VPS15*-Homologen in *C. albicans* bekannt ist, kann dabei von einer Konservierung des Zusammenwirkens von Vps34p und Vps15p ausgegangen werden.

#### 4.1.2 CaVps34p besitzt *in vitro* PI3-Kinase- und Proteinkinase-Aktivität

Um CaVps34p biochemisch näher charakterisieren zu können, wurde das Protein als HisTag-Fusionsprotein heterolog in *E.coli* exprimiert und aufgereinigt (Abschnitt 3.4). Die dabei erzielte Ausbeute an rekombinantem Protein war jedoch relativ gering. Allgemein ist die Effizienz der Expression eines bestimmten rekombinanten Proteins in einem speziellen Expressionssystem schwierig vorherzusagen. Meist muß empirisch bestimmt werden, welches System sich jeweils am besten eignet. Im Fall von CaVps34p wurde mit einem einfach zu handhabenden *E. coli*-Expressionssystem begonnen. Da es sich bei CaVps34p um ein Protein aus einem eukaryontischen Organismus handelt, welches zudem mit einem Molekulargewicht von 118 kDa relativ groß ist, sind die Schwierigkeiten bei seiner Expression in einem prokaryotischen Wirt möglicherweise durch Instabilität erklärbar. *E. coli* besitzt selbst keine PI3-Kinase, wie auch sonst in Prokaryoten die Existenz von PI3-Kinasen nicht bekannt ist. Um eine verbesserte Ausbeute an rekombinantem CaVps34p zu erhalten, müßten verschiedene andere bakterielle Expressionssysteme getestet werden. Unter Umständen könnte eine höhere Ausbeute rekombinanten Proteins z.B. durch Verwendung eines Expressionssystems erreicht werden, welches auf der Expression von CaVps34p als Fusionsprotein mit dem bakteriellen Maltose-Bindeprotein basiert (pMAL-Serie, New England Biolabs). Eine andere Möglichkeit besteht darin, auf ein eukaryontisches Proteinexpressionssystem überzugehen, um eine höhere Ausbeute und bessere Stabilität des rekombinanten Proteins zu erzielen. Erste Versuche zur Expression von CaVps34p als GST-Fusionsprotein in verschiedenen *S. cerevisiae*-Stämmen brachten jedoch ebenfalls nur geringe Ausbeuten. Schließlich besteht die Möglichkeit der Expression in Säugerzellen (z.B. COS7), die sich als sehr effektiv bei der Expression humaner PI3-Kinasen erwiesen haben.

Das aus *E. coli* gewonnene rekombinante CaVps34p zeigte bei *in vitro*-Untersuchungen eine starke PI3-Kinase-Aktivität (Abb. 3.5.1). Somit stellt die Expression von *CaVPS34* in *E. coli* trotz der geringen Proteinausbeute eine geeignete Möglichkeit dar, biologisch aktives CaVps34p zu gewinnen. Dieses kann für verschiedene *in vitro*-Tests zur weiteren biochemische Charakterisierung eingesetzt werden und steht darüberhinaus für die mögliche Verwendung bei der Suche nach Inhibitoren zur Verfügung. Solche aufzufindenden spezifischen Inhibitoren der PI3-Kinase CaVps34p könnten als potentielle antifungale Wirkstoffe Bedeutung besitzen.

Mit dem Nachweis der PI3-Kinase-Aktivität des rekombinanten Proteins wurden die Ergebnisse der Komplementationsuntersuchungen in *S. cerevisiae* bestätigt. Durch Untersuchung der Substratspezifität konnte außerdem gezeigt werden, daß CaVps34p ausschließlich Phosphatidylinositol in 3'-Stellung phosphoryliert (Abb. 3.8). Damit wird seine

Zugehörigkeit zur Klasse III der PI3-Kinase-Familie, in der alle Vps34p-homologen Proteine vereinigt sind, unterstrichen.

Die Sequenzanalyse der Lipidkinasedomäne von CaVps34p zeigt, daß darin intrinsische Motive enthalten sind, welche eine mögliche Proteinkinaseaktivität erwarten lassen (vgl. 1.5). In einem entsprechenden *in vitro*-Test konnte gezeigt werden, daß CaVps34p in der Lage ist, sich selbst zu phosphorylieren und somit als eine multispezifische Kinase mit Lipid- und Proteinkinaseaktivität anzusehen ist (Abb. 3.9). Demnach ist es möglich, daß CaVps34p über die beobachtete Autophosphorylierung selbst zu seiner Aktivierung beiträgt. Auch bei *S. cerevisiae* Vps34p wurde eine solche  $Mn^{2+}$ -abhängige Autophosphorylierung nachgewiesen, wobei die Bedeutung dieser Proteinkinaseaktivität bisher nicht geklärt werden konnte (Stack und Emr, 1994). Humane PI3-Kinasen der Klasse I besitzen ebenfalls Proteinkinaseaktivität (Dhand *et al.*, 1994, Stoyanova *et al.*, 1997, Vanhaesebroeck *et al.*, 1999). Trotz einiger Vermutungen konnte dieser Proteinkinaseaktivität jedoch noch keine eindeutige physiologische Bedeutung zugesprochen werden (Bondeva *et al.*, 1998, Lopez-Illasaca *et al.*, 1997). Das humane Homologe von Vps34p zeigt dagegen keine Autophosphorylierungsaktivität (Volinia *et al.*, 1995). Demzufolge kann vermutet werden, daß Vps34p in *C. albicans* wie auch in *S. cerevisiae* verglichen mit humanem Vps34p zusätzliche Funktionen erfüllt. Sehr interessant wäre deshalb neben der beobachteten Autophosphorylierung auch die Untersuchung einer möglichen exogenen Proteinkinaseaktivität von CaVps34p und die Identifizierung von Targetproteinen.

VPS34-Homologe aus *S. cerevisiae* und Humanzellen zeigen gegenüber dem bekannten PI3-Kinase-Inhibitor Wortmannin eine recht unterschiedliche Sensitivität. Während das humane Protein wie auch die anderen bekannten PI3-Kinasen aus Humanzellen bereits in nanomolaren Dosen sehr stark gehemmt wird, ist das Hefeprotein gegenüber Wortmannin relativ unempfindlich (Volinia *et al.*, 1995, Stack und Emr, 1994). Erst im mikromolaren Bereich ist hier eine Hemmwirkung zu beobachten, wobei dies schon an der Grenze zu einer unspezifischen Hemmwirkung liegt. Die Lipidkinaseaktivität von rekombinantem CaVps34p zeigte sich ebenfalls relativ insensitiv gegenüber Wortmannin (vgl. 3.5.1). Somit kann auch in Bezug auf die Wortmanninsensitivität eine Übereinstimmung mit Vps34p aus *S. cerevisiae* und ein deutlicher Unterschied gegenüber dem humanen Vps34p festgestellt werden. Diese Beobachtung stützt die Annahme, daß die Bedeutung der PI3-Kinase Vps34p in Hefen nur teilweise mit der Funktion von Vps34p in Humanzellen vergleichbar ist und möglicherweise weitere Aufgaben erfüllt. Denkbar wäre in diesem Zusammenhang, daß Vps34p in Hefen, bei denen es die einzige PI3-Kinase repräsentiert, zusätzlich Teilfunktionen von erst in höheren Organismen evolvierten PI3-Kinasen besitzt.

#### **4.1.3 PI3-Kinase-Aktivität in *C. albicans*-Proteinextrakten**

Die Analyse der Expression von CaVPS34 mittels Northern-Hybridisierung hatte gezeigt, daß die Abundanz der CaVPS34 mRNA sehr gering ist (Abschnitt 3.3). Bei der Untersuchung von Proteinextrakten des *C. albicans*-Wildtypstammes SC5314 aus der mittleren

exponentiellen Wachstumsphase im *in vitro*-Assay zeigten diese ebenfalls eine sehr geringe PI3-Kinase-Aktivität (Abb. 3.10). So konnten in den Membranfraktionen von *C. albicans* SC5314 sehr geringe Mengen PI(3)P nachgewiesen werden, während in cytosolischen Fraktionen keine Bildung von PI(3)P gefunden wurden. Dieser Unterschied korreliert mit dem Befund, daß die PI3-Kinase-Aktivität von Vps34p in *S. cerevisiae* durch die Membranassoziation des Proteins bedeutend verstärkt wird (Stack *et al.*, 1995). Demnach ist auch in *C. albicans* der Membrankontakt von CaVps34p wichtig für seine PI3-Kinase-Aktivität. Unerwartet war dagegen die Tatsache, daß die PI3-Kinase-Aktivität in *C. albicans* im Gegensatz zu *S. cerevisiae* nur sehr schwach nachgewiesen werden konnte. Demgegenüber war das im Test ebenfalls detektierte PI(4)P bei *C. albicans* SC5314 als ein ebenso prominenter Spot sichtbar wie bei dem mitgeführten *S. cerevisiae*-Stamm. Möglicherweise ist eine geringere PI3-Kinase-Stabilität in *C. albicans* die Ursache für den beobachteten Unterschied. Andererseits könnte das gebildete PI(3)P selbst einem rascheren Turnover z.B. durch Phosphatasen unterliegen. Denkbar wäre auch, daß die Bildung von PI(3)P in *C. albicans* einer sehr spezifischen räumlichen Regulation unterliegt oder daß es in Abhängigkeit von Umweltsignalen wie z.B. Osmostreß oder Nährstoffmangel zu einer Regulation der PI3-Kinase-Aktivität kommt.

Obwohl die in Proteinextrakten von *C. albicans* nachgewiesene PI3-Kinase-Aktivität sehr gering ist, führt die homozygote Disruption von *CaVPS34* zur Ausprägung einer ganzen Reihe deutlicher phänotypischer Konsequenzen. Diese Tatsache unterstreicht die Bedeutung von *CaVPS34* und kann als Hinweis auf eine sehr spezifische, aber dennoch essentielle Beteiligung der PI3-Kinase an bestimmten Signaltransduktionsprozessen im intrazellulären Vesikeltransport angesehen werden.

Im PI3-Kinase-Test mit Proteinextrakten der *CaVPS34*-Nullmutante wurde in keiner der Fraktionen eine PI3-Kinase-Aktivität festgestellt (Abb. 3.10). Dies ist ein weiterer Hinweis darauf, daß CaVps34p sehr wahrscheinlich die einzige PI3-Kinase in *C. albicans* darstellt.

## 4.2 Zelluläre Funktionen von *CaVPS34*

### 4.2.1 Rolle von *CaVPS34* bei der Aufrechterhaltung der Vakuolenmorphologie und -funktion

Die *CaVPS34*-Nullmutante zeigt im Unterschied zum *C. albicans* Wildtypstamm SC5314 einen hohen Anteil von Zellen mit stark vergrößerten Vakuolen (Abb. 3.15). Dieser Befund legt einen Einfluß von *CaVPS34* auf die Vakuolenhomöostase nahe, welche wiederum im Zusammenhang mit Membrantransportprozessen gesehen werden kann. Eine ähnliche Beeinflussung der Vakuolenmorphologie findet man auch bei *S. cerevisiae* *vps34*-Mutanten (Herman und Emr, 1990), wobei der Phänotyp vergrößerter Vakuolen im Vergleich zu *C. albicans* dort weniger stark ausgeprägt ist. Aus *S. cerevisiae* ist bekannt, daß Fab1p, ein Effektorprotein von PI(3)P, bei der Regulation der Homöostase der Va-

kulenmembran eine wichtige Rolle spielt. Dementsprechend zeigen *fab1*-Mutanten von *S. cerevisiae* beträchtlich vergrößerte Vakuolen (Yamamoto *et al.*, 1995). Diese Vergrößerung der Vakuolenoberfläche wird als Folge von Defekten im Turnover bzw. im Efflux der Vakuolenmembran diskutiert (Gary *et al.*, 1998). Das *FAB1*-Gen von *S. cerevisiae* kodiert für eine PI(3)P 5-Kinase, deren Substrat das von der PI3-Kinase Vps34p gebildete PI(3)P ist (Gary *et al.*, 1998). Somit ist Fab1p nicht nur ein "downstream"-Effektor von PI(3)P, sondern es wandelt PI(3)P darüberhinaus in PI(3,5)P<sub>2</sub>, einen weiteren Signalmediator in der PI(3)P-Signalkaskade, um. Aufgrund der großen phänotypischen Ähnlichkeit der *CaVPS34*-Nullmutante zu *S. cerevisiae fab1*-Mutanten und der Existenz eines *FAB1*-Homologen in *C. albicans* kann geschlußfolgert werden, daß auch in *C. albicans* ein *VPS34/FAB1*-abhängiger Pathway zur Regulation der Vakuolenhomöostase existiert. Um den Zusammenhang zwischen *CaVPS34* und *CaFAB1* näher zu untersuchen, wurde das *FAB1*-Gen aus *C. albicans* in unserer Arbeitsgruppe kloniert und wird derzeit funktionell charakterisiert.

Die transmissionselektronenmikroskopische (TEM) Analyse der *CaVPS34*-Nullmutante deckte weitere strukturelle Unterschiede dieses Stammes im Vergleich zum Wildtyp auf. So wurde bei der Untersuchung von protoplastierten Zellen festgestellt, daß die vergrößerten Vakuolen der Nullmutante elektronentransparent erscheinen, während die des Wildtypstammes elektronendicht waren (Abb. 3.17). Die verwendete Kontrastierungsmethode verstärkte den Kontrast von Lipidmembranen und glykomolekülhaltigen Strukturen. In Bezug auf die abweichende Vakuolenzusammensetzung des *CaVPS34*-disruptierten Stammes kann sowohl ein verringerter Gehalt an Glykoproteinen und -lipiden sowie Zuckern als auch ein Azidifizierungsdefekt diskutiert werden. Die Opazität der Vakuole wird als ein wahrscheinliches Maß der Vakuolenacidifizierung angesehen, da die Inaktivierung der vakuolären ATPase zu elektronentransparenten Vakuolen führt (Wurmser und Emr, 1998). Dies könnte wiederum einen eingeschränkten Import von Metaboliten, u.a. von Glykomolekülen, bedingen. Im Gegensatz zur *CaVPS34*-Nullmutante zeigt *S. cerevisiae vps34*-Mutante elektronendichte Vakuolen, die jedoch elektronentransparente Einschlüsse aufweisen (Banta *et al.*, 1988, Wurmser und Emr, 1998). Dagegen stimmt der Vakuolenphänotyp einer *S. cerevisiae fab1*-Mutante mit dem der *CaVPS34*-Nullmutante stärker überein, da *fab1*-Zellen ebenfalls stark vergrößerte und elektronentransparente Vakuolen aufweisen (Gary *et al.*, 1998).

Die ultrastrukturelle Untersuchung von intakten *C. albicans*-Zellen zeigte im *CaVPS34*-disruptierten Stamm eine auffällige aberrante Akkumulation von 20-30 nm großen Vesikeln an der periplasmatischen Seite der Cytoplasmamembran. Der Inhalt der sekretierten Vesikel bleibt im Periplasma von einer Membran umschlossen, ein sehr ungewöhnlicher Vorgang, für den es in der Literatur kaum Hinweise gibt. Ein Befund der Sekretion membranumschlossener Vesikel in Hefen wurde im Zusammenhang mit dem "opaque"-Phänotyp von *C. albicans* beschrieben (Anderson *et al.*, 1990). Diese Vesikel sind teilweise von einer Doppelmembran umgeben. Mit einem Durchmesser von 60-120 nm sind sie allerdings

deutlich größer als die in der *CaVPS34*-Nullmutante akkumulierten Vesikel. Ebenfalls zwischen Plasmamembran und Zellwand lokalisierte vesikelähnliche Strukturen (40-100 nm groß) fand man in *C. albicans*-Zellen unter Einwirkung des Lipid-Antibiotikums Iturin A (Thimon *et al.*, 1995). Iturin A beeinflusst die Funktion der Plasmamembran, führt darüberhinaus aber auch an intracytoplasmatischen Membranen, wie z.B. der Kernmembran, zu Veränderungen. Als Ursache der in der *CaVPS34*-Nullmutante beobachteten distinkten Vesikelakkumulationen könnten dagegen fehlsortierte endosomale Kompartimente angesehen werden. Aufgrund der Anhäufung der beobachteten Vesikel in durch Invaginationen der Plasmamembran abgegrenzten Arealen (Abb. 3.8.3) kann vermutet werden, daß die äußere Membran möglicher Carriervesikel mit der Plasmamembran fusioniert ist. Auf diese Weise könnten die in den Carriervesikeln enthaltenen primären Vesikel ins Cytoplasma gelangen. Dabei stellen die fehlsortierten Carriervesikel möglicherweise multivesikuläre Körper (MVB's) oder aber abgeschnürte Teile der eigentlichen MVB's dar. Das Fehlen von PI(3)P in der Membran der MVB's oder anderer endosomaler Transportintermediate könnte die Funktion von Proteinkomplexen, die normalerweise den Weitertransport entlang des biosynthetischen Pathways regulieren, beeinträchtigen. Der Ausfall einer Signalkomponente könnte somit letztendlich zum Fehlsortieren solcher endosomalen Kompartimente oder Teilen davon an die Plasmamembran führen.

Die Vakuole ist für eine Reihe von Anpassungsmechanismen an Umweltstreß von großer Bedeutung. So erhält sie beispielsweise die Ionenhomöostase der Zelle aufrecht und wirkt als osmoregulatorisches Kompartiment. Bei der Untersuchung der Wirkung von osmotischem Streß auf die *CaVPS34*-Nullmutante wurde eine Beeinträchtigung dieser regulatorischen Funktion festgestellt. Die Deletion beider Kopien von *CaVPS34* resultierte dabei in der Hypersensitivität von *C. albicans* gegenüber osmotischem Streß (Abb. 3.20). Darin zeigt sich eine Übereinstimmung mit *vps34*-Mutanten von *S. cerevisiae* und *S. pombe*, die ebenfalls unter hyperosmotischem Streß Wachstumsdefekte aufweisen (Herman und Emr, 1990, Kimura *et al.*, 1995). In den Hefen *S. cerevisiae* und *S. pombe* erfolgt bei osmotischem Streß eine Aktivierung der PI(3)P5-Kinase Fab1p (Dove *et al.*, 1997). Unter diesen Bedingungen ist die Aktivität von Fab1p demnach besonders wichtig, um die osmoregulatorische Funktion der Vakuole zu gewährleisten. Dabei erfolgt die Vps34p/Fab1p-abhängige Akkumulation von PI(3,5)P<sub>2</sub> unabhängig vom "high-osmolarity glycerol response" (HOG)-Pathway, welcher in *S. cerevisiae* und auch in *C. albicans* ebenfalls eine Rolle bei der Adaptation an osmotischen Streß spielt (Dove *et al.*, 1997, Alonso-Monge *et al.*, 1999). Aufgrund der erhöhten Osmosensitivität der *CaVPS34*-Nullmutante ist es sehr wahrscheinlich, daß die Adaptation an hyperosmotischen Streß in *C. albicans* gleichfalls im Zusammenhang mit der Funktion der PI(3)P5-Kinase Fab1p steht. Somit kann geschlossen werden, daß in *C. albicans* Vps34p und Fab1p innerhalb eines Pathways funktionell verbunden sind, welcher sowohl bei der Homöostase der Vakuolenmembran als auch bei der Osmostreßantwort eine wichtige Rolle spielt. Da anzunehmen ist, daß die Aktivität von Fab1p in *C. albicans* wie in *S. cerevisiae* streßabhängig reguliert wird,

stellt sich die Frage, ob in Reaktion auf hyperosmotischen Streß auch eine Aktivierung von CaVps34p erfolgt. Möglich wäre auch, daß der konstitutiv von CaVps34p gebildete PI(3)P-Pool als Substrat für CaFab1p bereits ausreichend ist. Um dies zu untersuchen, müßte der Gehalt von *C. albicans*-Zellen an PI(3)P und PI(3,5)P<sub>2</sub> im Verlauf einer Streßantwort verfolgt werden. Eine Möglichkeit einer solchen quantitativen Bestimmung selbst geringer Mengen von PI(3)P bzw. PI(3,5)P<sub>2</sub> besteht in der *in vivo*-Markierung ganzer Zellen mit myo-[2-<sup>3</sup>H]Inositol und der anschließenden Analyse mit Hilfe einer Anionen-Austausch-HPLC. Daneben könnte die Analyse dieser Phosphoinositidspezies auch mittels Massenspektrometrie (MALDI-TOF) erfolgen.

Bei der rasterelektronenmikroskopischen (REM) Untersuchung von *C. albicans* wurde deutlich, daß Zellen der *CaVPS34*-Nullmutante eine verringerte Stabilität aufweisen. Sowohl Hefezellen als auch Hyphen zeigten Invaginationen, die sehr wahrscheinlich durch das Kollabieren der vergrößerten Vakuolen während der Präparation der Zellen hervorgerufen wurden (vgl. Abb. 3.16). Die beobachteten Formveränderungen korrelierten mit dem Auftreten besonders großer Vakuolen, da beispielsweise jüngere Tochterzellen keine solchen Vertiefungen aufwiesen. Thimon *et al.* (1995) fanden vergleichbare Invaginationen bei *C. albicans*-Zellen nach Behandlung mit dem Lipopeptid-Antibiotikum Iturin A. Diese von einigen *Bacillus subtilis*-Stämmen produzierte antifungale Substanz bewirkt die Freisetzung von Elektrolyten und hochmolekularen Substanzen sowie den Abbau von Phospholipiden. Dementsprechend wird der im Rasterelektronenmikroskop nach Iturin-Behandlung beobachtete Verlust der normalen äußeren Form von *C. albicans* als Folge einer veränderten Zellpermeabilität und der damit verbundenen osmotischen Unausgeglichenheit diskutiert. Wahrscheinlich trägt auch in der *CaVPS34*-Nullmutante eine veränderte Zellmembranpermeabilität zur Ausprägung dieses Phänotyps bei. Diese Annahme wird durch die Beobachtung gestützt, daß sich in einer exponentiell wachsenden Kultur einige Zellen des Nullmutantenstammes mit Methylenblau anfärben lassen, während das beim Wildstamm SC5314 unter denselben Bedingungen nicht der Fall ist. Mit dem Verlust von *CaVPS34* gehen neben einer veränderten Vakuolenmorphologie demzufolge auch Plasmamembranveränderungen einher.

Eine weitere Besonderheit der *CaVPS34*-defizienten Zellen war das Auftreten von Pilusartigen Emergenzen der Zellwand (Abb. 3.16). Vergleichbare Strukturen sind in *C. albicans* bei sogenannten "opaque"-Zellen bekannt (Anderson *et al.*, 1990). Der Phänotypwechsel von der "white"- zur "opaque"-Form stellt neben dem Dimorphismus einen weiteren morphogenetischen Wechsel von *C. albicans* dar, welcher als mögliche Virulenzdeterminante diskutiert wird (Kvaal *et al.*, 1997). Es handelt sich dabei um einen komplexen Vorgang, der durch Umweltfaktoren beeinflusst wird und die Variation einer Reihe morphologischer und physiologischer Parameter umfaßt (Soll *et al.*, 1993). "Opaque"-Zellen zeigen an ihrer Oberfläche als "Pimples" (Pickel) und "Blebs" (Bläschen) bezeichnete Strukturen (Anderson *et al.*, 1990). Allerdings fehlen diese Strukturen in Hyphenzellen und sehr jungen Tochterzellen. Eine weitere Ähnlichkeit der *CaVPS34*-Nullmutante zu

“opaque”-Zellen besteht darin, daß die Vakuolen dieser Zellen ebenfalls vergrößert sind (Anderson *et al.*, 1990). Die Funktion der “Pimples” in “opaque”-Zellen ist bisher nicht bekannt. Bezüglich ihrer Entstehung wird angenommen, daß aus der Vakuole stammende Vesikel durch die Zellwand nach außen wandern und dabei Kanäle im Inneren der “Pimples” passieren. Dieser Vorgang könnte nach Anderson *et al.* (1990) durch den mechanischen Druck der großen Vakuole auf das umgebende Cytoplasma und der Organellen in Richtung der Zellperipherie ausgelöst werden. Berücksichtigt man die in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe von TEM-Untersuchungen gewonnenen Ergebnisse (vgl. 3.8.3), so läßt sich zwischen den Pilus-artigen Strukturen an der Zelloberfläche der *CaVPS34*-Nullmutante und der Beobachtung von aberranten Vesikelansammlungen im Periplasma ein möglicher Zusammenhang herstellen. Dabei ist es denkbar, daß die Vesikel bei fortgesetzter Akkumulation schließlich an einigen Stellen die Zellwand passieren, was als Pilus-artige Zellwandausstülpung sichtbar werden könnte. Allerdings wurden in der TEM-Analyse keine Pilus-artigen Strukturen der Zellwand gefunden, wahrscheinlich deshalb, weil sie in sehr viel geringerer Häufigkeit auftreten. So läßt die Beobachtung Pilus-artiger Strukturen im Zusammenhang mit Invaginationen im REM darauf schließen, daß die Ausbildung von Pili im Zusammenhang mit besonders großen Vakuolen steht und dabei auf bestimmte Zellwandareale beschränkt ist.

Da auch zelluläre Reaktionen auf Temperaturstreß vakuoläre Funktionen involvieren, wurde neben der Wirkung von Osmostreß auch eine mögliche Temperaturabhängigkeit des Wachstums der *CaVPS34*-Nullmutante untersucht. Wachstumsanalysen zeigten, daß beim Verlust beider Kopien von *CaVPS34* ein Wachstumseffekt auftritt, welcher sich zunächst im langsameren Wachstum der Nullmutante bei 28°C äußert (Abschnitt 3.8.5). Dieses allgemein im Vergleich zum Wildtypstamm verlangsamte Wachstum der Nullmutante spiegelt die Bedeutung *Vps34p*-abhängiger Vesikeltransport- und Signaltransduktionsprozesse für das normale Wachstum von *C. albicans* wider. In *S. cerevisiae* wurde beobachtet, daß bei Hitzeschock die Vakuolenmorphologie sowie Endocytosevorgänge verändert sind (Meaden *et al.*, 1999). So zeigen *S. cerevisiae* Nullmutanten mit Vakuolendefekten (z.B. *vps34*, *vps15*, *fab1*, *vps1*, *end1/vps11*, *vps16*, *vps33*) konditional-lethale Phänotypen in Abhängigkeit von der Temperatur (Herman und Emr, 1990, Yamamoto, 1995). Da in der vorliegenden Arbeit gefunden wurde, daß *C. albicans VPS34* sowohl bei der Regulation der Vakuolenmorphologie als auch bei Endocytoseprozessen (Abb. 3.15, 3.22) von Bedeutung ist, kann eine Rolle von *CaVPS34* bei der Anpassung an Temperaturstreß erwartet werden. Bei einer Temperatur von 28°C sind auch *S. cerevisiae vps34*-Mutanten in ihrem Wachstum lediglich verlangsamt. Im Gegensatz zu diesen Mutanten ist die *CaVPS34*-Nullmutante aber in der Lage, auch bei 37°C zu wachsen. Erst bei Temperaturen über 37°C zeigte sich ein temperatursensitiver Wachstumsdefekt der Mutante (Abschnitt 3.8.5). Diese im Vergleich zu einer *S. cerevisiae vps34*-Mutante geringere Temperatursensitivität der *CaVPS34*-Nullmutante zeigt, daß der Einfluß von *CaVPS34* auf die Temperaturstreßantwort in *C. albicans* weniger stark ist.

Die Untersuchung der Gesamtaktivität der Carboxypeptidase Y in der Nullmutante erbrachte einen weiteren Hinweis auf die Beteiligung von CaVps34p am intrazellulären Vesikeltransport zur Vakuole und somit an der Aufrechterhaltung wichtiger vakuolärer Funktionen. Dabei wurde in der Nullmutante eine sehr stark herabgesetzte CPY-Aktivität nachgewiesen (Abb. 3.21). Dies kann als Resultat eines gestörten biosynthetischen Proteintransportes in die Vakuole interpretiert werden. Darüberhinaus ist es möglich, daß eine veränderte Vakuolenzusammensetzung die Aktivierung der CPY und anderer vakuolärer Enzyme beeinträchtigt.

#### 4.2.2 Rolle von *CaVPS34* bei Endocytoseprozessen

Die bisher diskutierten phänotypischen Charakteristika der *CaVPS34*-Nullmutante zeigen, daß durch die Deletion von *CaVPS34* Defekte im intrazellulären Vesikeltransport vom Golgi zur Vakuole auftreten. In Pulse-Chase-Experimenten mit dem Endocytosemarker FM4-64 konnte gezeigt werden, daß *CaVPS34* außerdem beim endocytischen Transport von der Plasmamembran zur Vakuole eine Rolle spielt (Abschnitt 3.8.8). Bei *S. cerevisiae* wurde die Beteiligung von *VPS34* an Endocytoseprozessen durch den gestörten Transport des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste3p zur Vakuole gezeigt (Munn und Riezman, 1994). Darüberhinaus wurde festgestellt, daß der lipophile Fluoreszenzfarbstoff FM4-64 über denselben Endocytoseweg wie Ste3p in die Vakuole transportiert wird und sich aus diesem Grund als Endocytosemarker eignet (Vida und Emr, 1995).

Die in der *CaVPS34*-Nullmutante beobachtete Akkumulation von FM4-64 in kleinen Kompartimenten in der Nähe der Vakuole und die fehlende Ringfärbung der Vakuolenmembran zeigen, daß durch *CaVPS34* insbesondere ein später Schritt der Endocytose beeinflußt wird. Dieser späte Endocytoseschritt besteht im Transport von endocytisiertem Material aus präsumtiven prävakuolären Kompartimenten in die Vakuole. Auch in *S. cerevisiae* korreliert die Inaktivierung von Vps34p mit einer vergleichbaren Akkumulation des Endocytosemarkers und einer fehlenden Färbung der Vakuolenmembran (Wurmser and Emr, 1998). Bei einer verlängerten Inkubation mit dem Fluoreszenzfarbstoff wird die Vakuolenmembran der *CaVPS34*-Nullmutante etwas stärker angefärbt. Daraus kann geschlossen werden, daß der endocytische Transport von der Plasmamembran zur Vakuole nicht vollständig von CaVps34p abhängig ist. Möglicherweise gibt es noch einen alternativen endocytischen Vesikeltransportweg zur Vakuole. Denkbar ist aber auch, daß der Einfluß von CaVps34p in der Regulation der Effizienz des endocytischen Transports besteht. Das Fehlen von CaVps34p führt in diesem Fall zu einem starken Effizienzverlust, aber nicht zu einer vollständigen Blockierung des Transportmechanismus.

Aufgrund der gezeigten Bedeutung von *CaVPS34* für Endocytosevorgänge kann vermutet werden, daß, ähnlich wie für den Pheromonrezeptor Ste3p von *S. cerevisiae* nachgewiesen, auch in *C. albicans* der Transport bestimmter Plasmamembranrezeptoren in die Vakuole gestört bzw. sehr stark verlangsamt ist. Damit ergibt sich ein möglicher Einfluß von *CaVPS34* auf das Recycling und den Turnover von Plasmamembranrezeptoren,



wodurch der *CaVPS34*-abhängiger intrazellulärer Vesikeltransport mit dem Transmembransignalling gekoppelt sein könnte. Diese Annahme wird auch dadurch gestützt, daß in Humanzellen beobachtet wurde, daß anti-hVps34p-Antikörper mit dem Sorting von endocytisierten PDGF-Rezeptoren interferieren (Siddhanta *et al.*, 1999).

#### 4.2.3 Einfluß von *CaVPS34* auf das Hyphenwachstum

Morphogeneseprozesse, die die pathogene Hefe *C. albicans* zum Wachstum in der Hefe- oder Hyphenform befähigen, werden als ein wichtiger Virulenzmechanismus angesehen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte deshalb untersucht werden, ob *CaVPS34* einen Einfluß auf den Dimorphismus von *C. albicans* ausübt. Expressionsanalysen haben gezeigt, daß die Transkription von *CaVPS34* keiner spezifisch morphogeneseabhängigen, sondern einer wachstumsabhängigen Regulation unterliegt (Abb. 3.3, 3.4). Um zu überprüfen, ob *CaVps34p*-abhängige Prozesse einen Einfluß auf die Hyphenmorphogenese haben, wurde die Hefe-Hyphe-Transition der verschiedenen *C. albicans*-Stämme unter verschiedenen Induktionsbedingungen untersucht. Dabei zeigte sich, daß *C. albicans* nach Deletion beider Kopien von *VPS34* vollständig ihre Fähigkeit, auf festem Spidermedium mit Mannitol als C-Quelle sowie auf festem Serum-haltigem Medium Hyphen auszubilden, verloren hatte (Abb. 3.25).

Es ist bekannt, daß filamentöses Wachstum von *C. albicans* durch mindestens zwei parallele Signaltransduktionswege vermittelt wird. Das ist zum einen die Mitogen-aktivierte-Proteinkinase (MAPK)-Kaskade und zum anderen ein cAMP-abhängiger Mechanismus (Liu *et al.*, 1994, Stoldt *et al.*, 1997). Komponenten des MAPK-Weges sind an der Signaltransduktion filamentösen Wachstums in Reaktion auf bestimmte C-Quellen bzw. Nährstofflimitation beteiligt, während der cAMP-abhängige Mechanismus durch Serumfaktoren aktiviert wird. Eine Inaktivierung der korrespondierenden Transkriptionsfaktoren Cph1p (MAPK-Weg) und Efg1p (cAMP-Weg) resultiert in der Eliminierung der Hyphenbildung sowohl unter Seruminduktion als auch bei Nährstofflimitation. Der beobachtete Hyphenbildungsdefekt der *CaVPS34*-Nullmutante beim Koloniewachstum auf Serum- und "Spider"-Platten betrifft dementsprechend beide Signaltransduktionswege. Das weist darauf hin, daß die Bedeutung der Funktion von *CaVps34p* in einem Mechanismus zu suchen ist, der bei beiden Wegen wichtig ist. Ebenso ist es denkbar, daß durch *CaVPS34* ein weiterer, noch unbekannter Signaltransduktionsweg beeinflusst wird. Durch Feng *et al.* (1999) wurde gezeigt, daß die kleine GTPase Ras1p nicht nur dem cAMP-Weg zuzuordnen ist, sondern auch für die Serum-induzierte Hyphenbildung in *C. albicans* benötigt wird. Die eigentlichen Rezeptoren der verschiedenen Induktionssignale sind jedoch noch nicht bekannt. Eine mögliche Ursache des fehlenden Hyphenwachstums der *CaVPS34*-Nullmutante könnte sein, daß die Signaltransduktion morphogenetischer Signale durch noch nicht bzw. nicht eindeutig identifizierte Zelloberflächenrezeptoren beeinträchtigt ist. So sind z.B. in *S. cerevisiae* Recycling und Turnover des  $\alpha$ -Faktor-Rezeptors Ste3p gestört, wenn *Vps34p* inaktiviert wird (Munn und Riezman, 1993). Dieser Defekt beruht auf einem

beeinträchtigten endocytischen Vesikeltransport zur Vakuole wie er in Untersuchungen mit der *CaVPS34*-Nullmutante in dieser Arbeit auch bei *C. albicans* festgestellt werden konnte (Abb. 3.22). Demnach könnte eine gestörte Rezeptor-“downregulation” von Hypheninduktionsrezeptoren an den beobachteten Defekten der *CaVPS34*-Nullmutante bei der Hyphenmorphogenese beteiligt sein. Ein möglicher Kandidat für ein solches Rezeptorprotein könnte die Histidin-Kinase Sln1p sein (Yamada-Okabe *et al.*, 1999). Sie ist ein putatives Zelloberflächenprotein mit einer extrazellulären Sensordomäne, welches bei der Serum-induzierten Hyphenbildung von *C. albicans* eine Rolle spielt. Ein anderes möglicherweise durch *CaVPS34* in seiner Funktion beeinflusstes Rezeptorprotein ist das Integrin-ähnliche Protein Int1p. Dieses Protein ist nicht nur an der Adhäsion, sondern auch an der Hyphenmorphogenese von *C. albicans* beteiligt (Gale *et al.*, 1998). Da das filamentöse Wachstum einer *INT1*-Nullmutante auf Spider- und Milch-Tween-Agar gehemmt ist, zogen die Autoren eine Bedeutung des Oberflächenadhäsins als morphogenetischer Sensor für bestimmte Induktionsreize in Erwägung.

Deletionsmutanten des für eine Zweikomponenten-Histidinkinase kodierenden Gens *COS1* zeigen wie die *CaVPS34*-Nullmutante ebenfalls Defekte in der Hyphenbildung auf festen Medien bei Induktion durch Serum oder Nährstoffmangel (Alex *et al.*, 1998). *COS1* ist homolog zu der Histidinkinase *NIK1* aus *Neurospora crassa*, welche an der Hyphenbildung und an der Anpassung an Osmostress beteiligt ist (Alex *et al.*, 1996). Die Autoren vermuteten deshalb, daß der Hyphenbildungsdefekt der *COS1*-Mutante auf festen Oberflächen zumindest teilweise einen osmotischen Effekt beinhaltet. Dies könnte auch für die *CaVPS34*-Nullmutante zutreffen, womit ein Zusammenhang zwischen der eingeschränkten Vakuolenfunktion der Mutante und der Hyphenmorphogenese hergestellt wäre. Möglich wäre jedoch außerdem, daß der Kontakt zu einer festen Oberfläche ein zusätzliches Signal bei der Induktion von Hyphen darstellt, welches in der *CaVPS34*-Nullmutante nicht weitergeleitet wird. Dies kann als sehr wahrscheinlich angesehen werden, da mit dem Transkriptionsfaktors Czflp ein Regulator gefunden werden konnte, welcher an der Induktion der Hyphenbildung in Reaktion auf die physische Umgebung beteiligt ist (Brown Jr *et al.*, 1999). Für die *CaVPS34*-Nullmutante bedeutet dies, daß durch das Fehlen von *CaVPS34* die Czflp regulierende Signaltransduktionskaskade gestört sein könnte, wodurch der Übergang zu hyphalem Wachstum verhindert wird.

Bei der Induktion von Hyphen in flüssigen Medien (Serum, “Spider”) war die Hyphenmorphogenese der *CaVPS34*-Nullmutante ebenfalls beeinträchtigt (Abb. 3.23). So wurde eine starke Verzögerung des Übergangs zu filamentösem Wachstum beobachtet. Dabei war außerdem der Anteil an Pseudohyphen erhöht, und es wurden insgesamt nur etwa 80% Hyphen und Pseudohyphen gebildet. Diese Ergebnisse zeigen, daß der Einfluß von *CaVPS34* auf die Hyphenmorphogenese in Flüssigkultur weniger stark ist als auf festen Medien. Daraus ergibt sich ein weiterer Anhaltspunkt dafür, daß *CaVPS34* die Czflp-abhängige Signaltransduktion der Hyphenbildung beeinflusst. Eine mögliche Erklärung könnte außerdem sein, daß Regulationsfunktionen der Vakuole wie z.B. die Osmohomöostase beim Hyphenwachstum auf festen Oberflächen eine größere Rolle spielen.

#### 4.2.4 Einfluß von *CaVPS34* auf die Adhäsion an Fibroblastenzellen

Oberflächenproteine von Mikroorganismen spielen eine bedeutende Rolle als Sensoren von Umweltsignalen und bei Interaktionen mit anderen Zellen. Auch in *C. albicans* sind Zellwandproteine z.B. an der Adhäsion an epitheliale und endotheliale Zellen beteiligt. Dies wird als der erste Schritt des Interaktionsprozesses zwischen dem Pathogen und den Geweben des Wirts während einer Infektion angesehen (Odds, 1988). Um zu überprüfen, ob *CaVPS34* bei Wirts-Pathogen-Interaktionen von *C. albicans* von Bedeutung ist, wurden Adhäsionsversuche mit Maus-Fibroblastenzellen durchgeführt. Dabei zeigte die Nullmutante eine wesentlich verringerte Adhärenz im Vergleich zum Wildtypstamm (Abb. 3.26). Daraus läßt sich schlußfolgern, daß *CaVPS34* tatsächlich einen Einfluß auf die Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen ausübt. Als eine mögliche Ursache für diese Adhäsionsdefizienz der Nullmutante könnte vermutet werden, daß die Funktionsfähigkeit von Adhäsionsproteinen an der Zelloberfläche beeinträchtigt ist. So wurde z.B. für einen Stamm mit Deletion des Integrin-ähnlichen Proteins *Int1p* eine stark reduzierte Adhäsion von *C. albicans* an Wirtszellen beschrieben (Gale *et al.*, 1998). Solche Rezeptor-vermittelten Adhäsionsvorgänge könnten in der *CaVPS34*-Nullmutante dadurch gestört sein, daß, wie schon für die Hypheninduktion diskutiert, endocytische Transportprozesse integrinähnlicher Rezeptoren eingeschränkt sind. Denkbar wäre auch, daß aufgrund gestörter Vesikeltransportprozesse in der *CaVPS34*-Nullmutante die Sekretion und Reifung bestimmter Zellwandadhäsine beeinträchtigt ist. So wären beispielsweise Defekte in der O-Glykosylierung oder der Mannosylierung von Adhäsionsproteinen denkbar. Weiterhin könnte z.B. auch das "crosslinking" von  $\alpha$ -Agglutinin-ähnlichen Adhäsinen an das Kohlenhydratgerüst der Zellwand gestört sein. Außerdem könnten die beobachtete aberrante Sekretion membranumschlossener Vesikel ins Periplasma und die Bildung von Pili mit Adhäsionsvorgängen interferieren und dadurch zur verminderten Adhäsion der Nullmutante beitragen.

#### 4.3 Einfluß der Disruption von *CaVPS34* auf die Virulenz von *C. albicans* im Tiermodell

In den Virulenzuntersuchungen am embryonierten Hühnerei hatte sich herausgestellt, daß die Pathogenität der *CaVPS34*-Nullmutante gegenüber dem Wildtypstamm SC5314 drastisch verringert war (Abb. 3.27). Anschließend konnte dieses Ergebnis auch im Maus-Candidosis-Modell bestätigt werden: die *CaVPS34*-Nullmutante war avirulent (Abb. 3.28). Damit konnte gezeigt werden, daß *CaVPS34* eine bedeutende Rolle für die Virulenz von *C. albicans* spielt. In Verbindung mit der Avirulenz der Nullmutante wurde nachgewiesen, daß diese gleichzeitig nicht mehr in der Lage ist, die Nieren und andere innere Organe (Leber, Milz) infizierter Mäuse zu kolonisieren. Somit ist von einem Defekt in der Ausbreitungsfähigkeit der Mutante auszugehen. Wie in den vorangegangenen Untersuchungen festgestellt worden war, sind nach der homozygoten Disruption von *CaVPS34* verschiede-

ne Zellfunktionen von *C. albicans*, wie z.B. Adhäsion, Hyphenbildung oder Streßadaptation beeinträchtigt, welche einen Beitrag zu der beobachteten Avirulenz der Nullmutante leisten könnten. Für die Etablierung einer systemischen Infektion besitzen solche Virulenzfaktoren wie Adhäsion und Hyphenbildung eine große Bedeutung (vgl. 1.2). Es ist daher anzunehmen, daß sowohl eine herabgesetzte Adhäsionsfähigkeit als auch eine fehlende bzw. eingeschränkte Hyphenbildung der Nullmutante deren Ausbreitung im Wirtsorganismus wesentlich erschweren. Ebenso ist es denkbar, daß eine rasche Abtötung der *C. albicans*-Zellen durch immundefensive Mechanismen des infizierten Organismus, wie z.B. eine Phagozytose durch Makrophagen, stattfindet. Dabei könnte die Fehlsekretion zelleigenen Materials der *CaVPS34*-Nullmutante immunmodulatorische Wirkung haben und zur besseren Erkennbarkeit für das Immunsystem des Wirtes führen. In vorläufigen Untersuchungen zur Interaktion mit Makrophagen wurde festgestellt, daß diese eine deutliche Reaktion im Kontakt mit Zellen der *CaVPS34*-Nullmutante zeigen (K. Augsten, pers. Mitteilung). Zu erwarten ist außerdem, daß die Mutante aufgrund ihrer eingeschränkten Hyphenbildung im Gegensatz zum Wildtypstamm nicht in der Lage ist, aus Makrophagen wieder herauszuwachsen. Eine weitere Möglichkeit ist, daß die osmotische Instabilität der Nullmutante ihre Eliminierung durch Immunabwehrmechanismen erleichtert oder die Streuung innerhalb des Wirtsorganismus erschwert. Schließlich könnte die beobachtete Osmosensitivität der *CaVPS34*-Nullmutante auch einen Einfluß auf die Organbesiedelung ausüben, da bekannt ist, daß bestimmte Mikrohabitate z.B. innerhalb der Nieren für *C. albicans* mit osmotischem Streß verbunden sind (Odds, 1988). Es kann außerdem nicht ausgeschlossen werden, daß die leicht verminderte Wachstumsrate der *CaVPS34*-Nullmutante teilweise zur Reduktion ihrer Virulenz beiträgt.

#### **4.4 *CaVPS34* – ein mögliches Target zur Suche nach antifungal wirksamen Substanzen**

Die Virulenzstudien im Maus-Candidosis-Modell haben gezeigt, daß *CaVPS34* von essentieller Bedeutung für die Pathogenität von *C. albicans* in einer systemischen Infektion ist. Somit könnte ein Protein, welches an der Signaltransduktion intrazellulärer Transportprozesse beteiligt ist, ein Target zur Suche nach antifungal Substanzen sein.

Im Zuge der Charakterisierung von *CaVPS34* wurde festgestellt, daß diese Phosphatidylinositol3-Kinase für eine Reihe von Zellfunktionen Bedeutung besitzt. Die Inhibierung der PI3-Kinase durch einen spezifischen Wirkstoff würde dementsprechend zum Ausschalten der verschiedenen durch *CaVPS34* beeinflussten Funktionen führen. Da *C. albicans*-Zellen ohne *CaVPS34* im Mausmodell nicht nur avirulent, sondern auch nicht mehr in der Lage waren, innere Organe zu kolonisieren, würde auf diese Weise eine Eliminierung von *C. albicans* aus dem Wirtsorganismus und damit das Ziel einer antifungal Therapie erreicht werden.

Bisher wurde die Suche nach geeigneten Targets vor allem auf pilzspezifische Gene, die keine Überlappung mit Säugetier-Genen aufweisen, ausgerichtet. Die Anzahl solcher Ge-

ne ist jedoch stark limitiert, wodurch die Angriffsmöglichkeiten für Antimykotika ebenfalls eingeschränkt sind. Eine Alternative dazu ist, die gewünschte Spezifität durch die jeweilige antifungal wirksame Substanz zu erreichen, um Nebenwirkungen im menschlichen Organismus möglichst gering zu halten. Eine solche Vorgehensweise wäre für die im Rahmen dieser Arbeit charakterisierte PI3-Kinase CaVps34p denkbar, deren Sensitivität gegenüber dem Naturstoff Wortmannin stark von der des humanen Homologen abweicht. In Humanzellen wird die Lipidkinaseaktivität von PI3-Kinasen schon bei geringsten Mengen des Inhibitors Wortmannin ( $IC_{50} \approx 50 \text{ nM}$ ) gehemmt (Arcaro *et al.*, 1993, Volinia *et al.*, 1995). Vps34p aus der Hefe *S. cerevisiae* hingegen ist gegenüber Wortmannin relativ unempfindlich. Erst mikromolare Konzentrationen des Inhibitors ( $IC_{50} = 3 \mu\text{M}$ ) führen hier zu einer Hemmung der Enzymaktivität (Stack und Emr, 1994). Auch das *C. albicans*-Homologe zeigte sich relativ insensitiv gegenüber Wortmannin (vgl. 3.5.1). Diese Tatsache verdeutlicht, daß trotz signifikanter Homologie auf Aminosäureebene bereits geringe Unterschiede in der Konformation der Proteine einen entscheidenden Einfluß auf die Sensitivität gegenüber Inhibitoren ausüben. Dementsprechend könnten andere noch aufzufindende Wirkstoffe umgekehrt pilzliche PI3-Kinasen selektiv bzw. mit sehr viel höherer Effizienz als humane Homologe hemmen. Die PI3-Kinase VPS34 aus *C. albicans* stellt somit ein mögliches Target für die Suche nach neuen Antimykotika dar.

Da die CaVPS34-Nullmutante gegenüber einigen bekannten Antimykotika (z.B. Clotrimazol, Fluconazol, 5-Fluorocytosin) eine erhöhte Sensitivität zeigt, wäre es auch denkbar, einen Wirkstoff gegen CaVps34p in Kombination mit einem bereits in Gebrauch befindlichen Antimykotikum einzusetzen, um eine bessere Wirksamkeit zu erzielen.

#### **4.5 Funktionelle Verbindung zwischen CaVPS34 und ScTOR2: Beeinflußt VPS34 die TOR2-abhängige Kontrolle der Aktinzytoskelettorganisation?**

Neben der Charakterisierung der PI3-Kinase CaVPS34 stellte die Identifizierung möglicher weiterer PI-Kinasen bzw. PI-Kinase-verwandter Proteine ein Anliegen dieser Arbeit dar. Der dazu angewandte PCR-Homologieansatz erbrachte die Identifizierung einer zu TOR1 und TOR2 aus *S. cerevisiae* homologen Sequenz (Abschnitt 3.9). Der vollständige ORF von CaTOR zeigt zu TOR1 und TOR2 aus *S. cerevisiae* gleichstarke Homologien (S. Gröbl, 2000). Somit wurde gezeigt, daß in *C. albicans* mindestens ein zur Familie der PI-Kinase-ähnlichen Proteine gehörendes Protein konserviert ist. Die aus *S. cerevisiae* bekannten Funktionen der TOR-Gene bei der Zellzykluskontrolle und der Aktinzytoskelettorganisation lassen auf eine wichtige Rolle von CaTOR bei den entsprechenden Signaltransduktionsprozessen in *C. albicans* schließen. Bisher ist für keines der bekannten Tor-Proteine eindeutig eine Lipidkinaseaktivität nachgewiesen worden, obwohl die Lipidkinasedomäne in allen Proteinen der Familie konserviert ist. Demzufolge stellt die Frage, auf welche Weise CaTorp die vermuteten Signaltransduktionsfunktionen ausübt, einen

weiteren Ansatzpunkt für zukünftige Untersuchungen dar. Von Interesse ist dabei auch zu klären, ob in *C. albicans* ein einziges *TOR*-Homologes diese Funktionen erfüllt.

Im Zusammenhang mit der im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Beeinflussung wichtiger Virulenzeigenschaften durch die PI3-Kinase *CaVPS34* besteht eine interessante Fragestellung darin, Hinweise für eine mögliche Interaktion von *CaVPS34* mit *TOR*-abhängigen Regulationsvorgängen zu gewinnen. Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurde deshalb durch Komplementationsversuche mit *S. cerevisiae tor2<sup>ts</sup>*- und *tor1 tor2<sup>ts</sup>*-Mutanten untersucht, ob *CaVPS34* bei Überexpression in der Lage ist, den *ts*-Phänotyp dieser Mutanten zu supprimieren (3.10). Dabei konnte der Wachstumsdefekt von *tor1 tor2<sup>ts</sup>*-Mutanten nicht durch *CaVPS34* komplementiert werden. Die Überexpression von *CaVPS34* erlaubte jedoch das Wachstum einer *tor2<sup>ts</sup>*-Mutante bei der nichtpermissiven Temperatur von 37°C (3.31). Somit konnte gezeigt werden, daß der Wachstumsdefekt dieser Mutante, dem ein Defekt der Organisation des Aktinzytoskeletts zugrunde liegt, durch *CaVPS34* supprimiert wird. Über einen solchen Suppressionseffekt ist im Zusammenhang mit *S. cerevisiae VPS34* bisher nichts bekannt. Es wurde jedoch nachgewiesen, daß ScTor2p an der Vakuolenoberfläche lokalisiert ist und daß dies für seine Funktion essentiell ist (Cardenas und Heitman, 1995). Daraus könnte geschlossen werden, daß *VPS34* über die Bildung von PI(3)P und die entsprechenden Effektorproteine einen Einfluß auf die Aktivität von *TOR2* ausübt. Die Inaktivierung der Tor-Proteine wiederum führt in *S. cerevisiae* zur Ausbildung stark vergrößerter Vakuolen (Cardenas *et al.*, 1995). Die Autoren vermuteten deshalb eine Beteiligung von Tor1p/Tor2p an der Regulation der Vakuolenmorphologie. Da auch die Disruption von *VPS34* vergrößerte Vakuolen zur Folge hat, könnte in dieser phänotypischen Ähnlichkeit ein weiterer Anhaltspunkt für eine funktionelle Verbindung von *VPS34* und *TOR2* gesehen werden. Die Regulation der Zellzyklus-abhängigen Polarisierung des Aktinzytoskeletts ist eine *TOR2*-spezifische Funktion (Schmidt *et al.*, 1996). Nach bisherigen Erkenntnissen verläuft die daran beteiligte Signalkaskade über einen GTPase-Switch, an dem die Proteine Rom2 (GDP/GTP-Austauschfaktor), Rho1/Rho2 (GTPasen) und Sac7 (GTPase-Aktivator) beteiligt sind (Schmidt *et al.*, 1997). Die Gene *RHO2* und *ROM2* wurden dabei als Multicopy-Suppressoren der *TOR2*-spezifischen Signalkaskade aus *S. cerevisiae* identifiziert (Helliwell *et al.*, 1998). Auf diese Weise wurden auch die Phospholipidkinasen *MSS4* und *PLC1* in Beziehung zum *TOR2*-spezifischen Signalweg gesetzt. Beide Gene sind darüberhinaus in der Lage, Defekte des *TOR1/TOR2* gemeinsamen Signalweges bei der Zellzykluskontrolle zu supprimieren.

Mit der Suppression des *TOR2*-spezifischen Wachstumsdefekts durch *CaVPS34* wurde eine Verbindung zwischen der an der Signaltransduktion intrazellulärer Vesikeltransportprozesse beteiligten PI3-Kinase Vps34p und dem für die Organisation des Aktinzytoskeletts essentiellen PI-Kinase-verwandten Proteins Tor2p gefunden. Daraus ergeben sich mögliche Modelle für ein funktionelles Zusammenwirken von Vps34p und Tor2p, wobei jedoch nicht geklärt ist, ob die Lipidkinase- oder die Proteinkinaseaktivität von CaVps34p den beobachteten Suppressionseffekt ermöglicht. Es ist nicht sehr wahrscheinlich, daß Vps34p und Tor2p in einem gemeinsamen Signaltransduktionsweg liegen, da die

Mutanten-Phänotypen beider Gene zu verschieden sind (*vps34*: lebensfähig/*tor2*: lethal). Möglich wäre jedoch ein “downstream” von beiden gelegenes Verbindungselement, welches den unterschiedlichen Signalwegen gemeinsam ist. Ein solcher Effektor könnte sowohl von Tor2p als auch von *CaVPS34* unterschiedlich stark reguliert werden. Die Wirkung von Tor2p auf den Effektor stellt dabei einen essentiellen Vorgang dar. *CaVps34p* aktiviert oder inaktiviert möglicherweise nur einen Teil der Moleküle dieser gemeinsamen Komponente. Bei einem Überschuß an *CaVps34p* könnte dieses dann in einer Art Bypass-Reaktion das Fehlen von aktivem Tor2p supprimieren. Alternativ könnte *CaVPS34* die *ts*-Mutation supprimieren, indem es die physische Assoziation von mutiertem Tor2p mit anderen Proteinen bzw. seine Vakuolenmembranlokalisierung fördert. Dabei wäre die direkte Bindung von PI(3)P als ersatzweise Voraussetzung für die Aktivität von Tor2p ebenso denkbar wie die fördernde Wirkung von PI(3)P bei der Membranassoziation als Voraussetzung für die Verfügbarkeit anderer Membranlipide oder Proteine. Komplementationsversuche mit einem mutierten *CaVPS34*, dem die Lipidkinaseaktivität fehlt, dessen Proteinkinaseaktivität jedoch erhalten bleibt, könnten zur Klärung der Frage beitragen, ob die Lipidkinaseaktivität von *CaVps34p* für die Suppression des Wachstumsdefekts der *tor2<sup>ts</sup>*-Mutante verantwortlich ist.

Ausgehend von dem gefundenen funktionellen Zusammenhang zwischen *CaVPS34* und *ScTOR2* ergibt sich somit ein interessanter Ansatzpunkt für die Untersuchung der Funktion des *TOR1/TOR2*-Homologen in *C. albicans*, wobei möglicherweise eine Vernetzung mit *CaVPS34*-abhängigen Signaltransduktionsprozessen aufgedeckt werden kann.

## 5. Zusammenfassung

Das Ziel der vorliegenden Arbeit bestand darin, die Phosphatidylinositol3-Kinase Vps34p aus *C. albicans* funktionell zu charakterisieren und ihre Bedeutung für die Virulenz dieser humanpathogenen Hefe aufzuklären.

Durch Komplementation einer *S. cerevisiae* *vps34*-Mutante konnte eine funktionelle Homologie von CaVps34p und ScVps34p gezeigt werden, womit ein erster Hinweis auf eine Konservierung der Funktion von Vps34p im intrazellulären Vesikeltransport vom Golgi zur Vakuole in *C. albicans* gewonnen wurde. Zudem lieferten *in vitro*-Tests mit rekombinantem HisTag-CaVps34p den Beweis, daß CaVps34p eine Phosphatidylinositol-spezifische PI3-Kinase und darüberhinaus zur Autophosphorylierung fähig ist. Northern-Analysen ergaben, daß die Regulation der Expression von *CaVPS34* wachstumsabhängig erfolgt. Proteinextrakte von *C. albicans*-Wildtypzellen zeigten eine schwache membranassoziierte PI3-Kinase-Aktivität, welche *CaVPS34*-defizienten Zellen fehlt. Die Nullmutation von *CaVPS34* resultierte außerdem in deutlich vergrößerten Vakuolen, woraus sich eine Rolle von CaVps34p beim Erhalt der Vakuolenhomöostase ableiten läßt. Weitere Befunde wie die erhöhte Sensitivität der Nullmutante gegenüber Osmostreß sowie die verringerte Aktivität einer vakuolären Hydrolase (CPY) sprechen ebenfalls für eine Beeinträchtigung vakuolärer Funktionen. Durch die Analyse der Ultrastruktur der Nullmutante wurde ein Azidifizierungsdefekt bzw. eine veränderte Zusammensetzung der Vakuole aufgezeigt. Außerdem wurde eine aberrante Sekretion membranumschlossener Vesikel ins Periplasma beobachtet, welche für eine Fehlleitung ("missorting") von normalerweise zur Vakuole transportierten Vesikeln spricht. Weiterhin konnte nachgewiesen werden, daß CaVps34p auch an Endocytoseprozessen beteiligt ist. So war in *CaVPS34*-defizienten Zellen der Transport des fluoreszenten Endocytosemarkers FM4-64 aus präsumtiven prävakuolären Kompartimenten in die Vakuole stark beeinträchtigt.

In der vorliegenden Arbeit konnten wichtige Erkenntnisse zur Bedeutung von CaVps34p für die Virulenz von *C. albicans* gewonnen werden. Dabei wurde zum einen festgestellt, daß die Nullmutante unter verschiedenen Bedingungen deutliche Defekte bei der Bildung von Hyphen aufweist und CaVps34p demnach eine wichtige Rolle beim morphogenetischen Wechsel zwischen der Hefe- und der Hyphenform (Dimorphismus) von *C. albicans* spielt. Zum anderen war die Adhäsion der Nullmutante an Maus-Fibroblasten im Test stark herabgesetzt, womit gezeigt werden konnte, daß ein weiterer Virulenzfaktor von *C. albicans* durch CaVps34p beeinflusst wird. Schließlich erbrachten Infektionsversuche den direkten Beweis, daß CaVps34p essentiell für die Pathogenität von *C. albicans* ist. So war die Nullmutante im Maus-Candidosis-Modell avirulent und nicht in der Lage, die Nieren zu besiedeln. Aufgrund dieser Resultate stellt die PI3-Kinase CaVps34p ein mögliches Target für die Suche nach antifungalen Wirkstoffen dar.



# Literaturverzeichnis

**Alex, L.A., K.A. Borkovich, und M.I. Simon (1996).**

Hyphal development in *Neurospora crassa*: involvement of a two-component histidine kinase. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 3416-3421

**Alex, L.A., C. Korch, C.P. Selitrennikoff, und M.I. Simon (1998).**

*COS1*, a two component histidine kinase that is involved in hyphal development in the opportunistic pathogen *C. albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95: 7069-7073

**Alonso-Monge, R., F. Navarro-Garcia, G. Molero, R. Diez-Orejas, M. Gustin, J. Pla, M. Sanchez, und C. Nombela (1999).**

Role of the mitogen-activated protein kinase Hog1p in morphogenesis and virulence of *C. albicans*. J. Bacteriol. 181: 3058-3068

**Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, und D.J. Lipman (1990).**

Basic local alignment search tool. J. Mol. Biol. 215: 403-410

**Anderson, J., R. Mihalik, und D.R. Soll (1990).**

Ultrastructure and Antigenicity of the unique cell wall pimple of the *Candida* Opaque Phenotype. J. Bacteriol. 172: 224-235

**Arcaro, A., und M.P. Wymann (1993).**

Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. Biochem. J. 296: 297-301

**Bailey, D.A., P.F.J. Feldman, M. Bovey, N.A.R. Gow, und A.J.P. Brown (1996).**

The *Candida albicans* *HYR1* gene, which is activated in response to hyphal development belongs to a gene family encoding yeast cell wall proteins. J. Bacteriol. 278: 5353-5360

**Bankaitis, V.A., L.M. Johnson, und S.D. Emr (1986).**

Isolation of yeast mutants defective in protein targeting to the vacuole. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83: 9075-9079

**Banta, L.M., J.S. Robinson, D.J. Klionsky, und S.D. Emr (1988).**

Organelle assembly in yeast: Characterization of yeast mutants defective in vacuolar biogenesis. J. Cell Biol. 107: 1369-1383

**Bastert, J., und H.C. Korting (1999).**

Review article: Molecular basis of antimycotic therapy. Mycoses 42: 73-79

**Berridge, M.J., und R.F. Irvine (1989).**

Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 341: 197-205

**Birnboim, H.C. und J. Dooly (1979).**

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7: 1513-1523

**Boeke, J.D., F. LaCroute, und G.R. Fink (1984).**

A positive selection for mutants lacking orotidine-5'-phosphate decarboxylase activity in yeast: 5-fluoro-orotic acid resistance. *Mol. Gen. Genet.* 197: 345-346

**Bondeva, T., L. Pirola, G. Bulgarelli-Leva, I. Rubio, R. Wetzker, und M.P. Wymann (1998).**

Bifurcation of lipid and protein kinase signals of PI3K $\gamma$  to the protein kinases PKB and MAPK. *Science* 282: 293-296

**Borg-von Zepelin, M., und T. Wagner (1995).**

Fluorescence assay for the detection of adherent *Candida* yeasts to target cells in microtest plates. *Mycoses* 38: 339-347

**Bormann, N.E., und P.P. Cleary (1997).**

Transcriptional analysis of *mga*, a regulatory gene in *Streptococcus pyogenes*: identification of monocistronic and bicistronic transcripts that phase vary. *Gene* 200: 125-134

**Bouchara, J.P., G. Tronchin, V. Annaix, R. Robert, J.M. Senet (1990).**

Laminin receptors on *Candida albicans* germ tubes. *Infect. Immun.* 58: 48-54

**Bradford, M.M. (1976).**

A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72:248-254

**Braun, B.R., und A.D. Johnson (1997).**

Control of filament formation in *Candida albicans* by the transcriptional repressor *TUP1*. *Science* 277: 105-109

**Brown, A.J.P., und N.A.R. Gow (1999).**

Regulatory networks controlling *Candida albicans* morphogenesis. *Trends in Microbiology* 7: 333-338

**Brown Jr., D.H., A.G. Giusani, X. Chen, und C.A. Kumamoto (1999).**

Filamentous growth of *Candida albicans* in response to environmental cues and its regulation by the unique *CZF1* gene. *Mol. Microbiol.* 34: 651-662

**Bryant, N.J., und T.H. Stevens (1998).**

Vacuole biogenesis in *S. cerevisiae*: protein transport pathways to the yeast vacuole. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 230-247

**Burd, C.G., und S.D. Emr (1998).**

Phosphatidylinositol(3)-phosphate signaling mediated by specific binding to RING FYVE domains. *Mol. Cell* 2: 157-162

**Buurman, E.T., C. Westwater, B. Hube, A.J.P. Brown, F.C. Odds, und N.A.R. Gow (1998).**

Molecular analysis of CaMnt1p, a mannosyl transferase important for adhesion and virulence of *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 7670-7675

**Calderone, R.A., und P.C. Braun (1991).**

Adherence and receptor relationships of *Candida albicans*. *Microbiol. Rev.* 55: 1-20

**Calvert, C.M., und D. Sanders (1995).**

Inositol trisphosphate-dependent and -independent  $\text{Ca}^{2+}$  mobilization pathways at the vacuolar membrane of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 270: 7272-7280

**Calvin, N.M., und P.C. Hannawalt (1988).**

High-efficiency transformation of bacterial cells by electroporation. *J. Bacteriol.* 170: 2796-2801

**Cardenas, M.E., und J. Heitman (1995).**

FKBP12-rapamycin target TOR2 is a vacuolar protein with an associated phosphatidylinositol 4-kinase activity. *EMBO J.* 14: 5892-5907

**Carpenter, C. L., und L. C. Cantley (1996).**

Phosphoinositide kinases. *Curr. Op. Cell Biol* 8: 153-158

**Cereghino, J.L., E.G. Marcusson, und S.D. Emr (1995).**

The cytoplasmic tail domain of the vacuolar protein sorting receptor Vps10p and a subset of VPS gene products regulate receptor stability, function, and localization. *Mol. Biol. Cell* 6: 1089-1102

**Chaffin, W. L., J.L. López-Ribot, M. Casdanova, D. Gozalbo, und J. P. Martinez (1998).**

Cell Wall and Secreted Proteins of *Candida albicans* : Identification, Function, and Expression. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 62: 130-180

**Chu, W.S., B.B. Magee, und P.T. Magee (1993).**

Construction of an SfiI macrorestriction map of the *Candida albicans* genome. *J. Bacteriol.* 175: 6637-6651

**Cowles, C.R., W.B. Snyder, C.G. Burd, und S.D. Emr (1997).**

Novel Golgi to vacuole delivery pathway in yeast: identification of a sorting determinant and required transport component. *EMBO J.* 15: 2769-2782

**Csank, C., K. Makris, S. Meloche, K. Schröppel, M. Röllinghoff, D. Dignard, D.Y. Thomas, und M. Whiteway (1997).**

Derepressed hyphal growth and reduced virulence in a VH1 family-related protein phosphatase mutant of the human pathogen *Candida albicans*. Mol. Biol. Cell 8: 2539-2551

**Csank, C., K. Schröppel, E. Leberer, D. H Marcus, O. Mohamed, S. Meloche, D.Y. Thomas, und M. Whiteway (1998).**

Roles of the *Candida albicans* mitogen-activated protein kinase homolog Cek1p in hyphal development and systemic candidiasis. Infect. Immun. 66: 2713-2722

**Cutler, J.E. (1991).**

Putative virulence factors of *C. albicans*. Annu. Rev. Microbiol. 45: 187-218

**DeCamilli, P., S.D. Emr, P.S. McPherson, und P. Novick (1996).**

Phosphoinositides as regulators in membrane traffic. Science 271: 1533-1539

**Delbrück, S., und J.F. Ernst (1993).**

Morphogenesis-independent regulation of actin transcript levels in the pathogenic yeast *C. albicans*. Mol. Microbiol. 10: 859-866

**Dellaporta, S., J. Wood, und J. Hicks (1985).**

Maize DNA miniprep. In: Molecular Biology of Plants - a Laboratory Course Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY: 36-37

**Dhand, R., I. Hiles, G. Panayotou, S. Roche, M.J. Fry, I. Gout, N.F. Trotty, O. Truong, P. Vicendo, K. Yonezawa, M. Kasuga, S.A. Courtneidge, und M.D. Waterfield (1994).**

PI 3-kinase is a dual specificity enzyme: autoregulation by an intrinsic protein-serine kinase activity. EMBO J. 13: 522-533

**Doi, M., M. Homma, A. Chindamporn, und K. Tanaka (1992).**

Estimation of chromosome number and size by pulse-field gel electrophoresis (PFGE) in medically important *Candida*-species. J. Gen. Microbiol. 138: 2243-2251

**Dove, S.K., F.T. Cooke, M.R. Douglas, L.G. Sayers, P.J. Parker, und R.H. Mitchell (1997).**

Osmotic stress activates phosphatidylinositol-3,5-bisphosphate synthesis. Nature 390: 187-192

**Dower, W.J., J.F. Miller, und C.W. Rangsdale (1988).**

High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. Nucleic Acids Res. 16: 6127-6145

**Eck, R., A. Bruckmann, R. Wetzker, und W. Künkel**

A phosphatidylinositol 3-kinase of *Candida albicans*: molecular cloning and characterization. Yeast (im Druck)

**Ernst, J.F., und A. Schmidt (Herausgeber) (2000).**

Dimorphism in Human Pathogenic and Apathogenic Yeasts. Contributions to Microbiol.5, Karger, Basel

**Entian, K.-D., T. Schuster, J.H. Hegemann et al. (1999).**

Functional analyses of 150 deletion mutants in *Saccharomyces cerevisiae* by a systematic approach. Mol. Gen. Genet. 262: 683-702

**Feinberg, A.P., und B. Vogelstein (1984).**

A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Addendum Anal. Biochem. 137: 266-267

**Feng, Q., E. Summers, B. Guo, und G. Fink (1999).**

Ras signaling is required for serum-induced hyphal differentiation in *Candida albicans*. J. Bacteriol. 181: 6339-6346

**Fonzi, W.A., und M.Y. Irwin (1993).**

Isogenic strain construction and gene mapping in *C. albicans*. Genetics 134: 717-728

**Fu, Y., G. Rieg, W.A. Fonzi, P.H. Belanger, J.E. Edwards Jr, und S.G. Filler (1998).**

Expression of the *Candida albicans* *ALS1* in *Saccharomyces cerevisiae* induces adherence to endothelial and epithelial cells. Infect. Immun. 66: 1783-1786

**Fukazawa, Y., und K. Kagaya (1997).**

Molecular bases of adhesion of *C. albicans*. J. Med. Vet. Mycol. 35: 87-99

**Gadd, G.M., und S.A. Foster (1997).**

Metabolism of inositol 1,4,5-trisphosphate in *Candida albicans*: significance as a precursor of inositol polyphosphates and in signal transduction during the dimorphic transition from yeast cells to germ tubes. Microbiol. 143: 437-448

**Gale, C.A., D. Finkel, N. Tao, M. Meinke, M. McClellan, J. Olson, K. Kendrick, und M.K. Hostetter (1996).**

Cloning and expression of a gene encoding an integrin-like protein in *C. albicans*. Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 357-361

**Gale, C.A., C.M. Bendel, M. McClellan, M. Hauser, J.M. Becker, J. Berman, und M.K. Hostetter (1998).**

Linkage of adhesion, filamentous growth, and virulence in *C. albicans* to a single gene, *INT1*. Science 279: 1355-1358

**Gammie, A.E., L.J. Kurihara, R.B. Vallee, und M.D. Rose (1995).**

*DNM1*, a dynamin-related gene, participates in endosomal trafficking in yeast. J. Cell Biol. 130: 553-566

**Gary, J.D., A.E. Wurmser, C.J. Bonangelino, L.S. Weisman, und S.D. Emr (1998).**

Fab1p is essential for PI(3)P 5-kinase activity and the maintenance of vacuolar size and homeostasis. *J. Cell Biol.* 143: 65-79

**Gaur, N.K., und S.A. Klotz (1997).**

Expression, cloning, and characterization of a *Candida albicans* gene, *ALA1*, that confers adherence properties upon *Saccharomyces cerevisiae* for extracellular matrix proteins. *Infect. Immun.* 65: 5289-5294

**Gehrmann, T., und L.M.G. Heilmeyer Jr (1998).**

Phosphatidylinositol 4-kinases. *Eur J. Biochem.* 253: 357-370

**Georgopapadakou, N.F., und T.J. Walsh (1996).**

Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 40: 279-291

**Ghannoum, M.A., G.R. Burns, K.A. Alteen, und S.S. Radwan (1986).**

Experimental evidence for the role of lipids in adherence of *Candida* ssp. to human buccal epithelial cells. *Infect. Immun.* 54: 189-193

**Ghannoum, M.A., I. Swairjo, und D.R. Soll (1990).**

Variation in lipid and sterol contents in *Candida albicans* white and opaque phenotypes. *J. Med. Vet. Mycol.* 28: 103-117

**Gimeno, C.J., P.O. Ljungdahl, C.A. Styles, und G.R. Fink (1992).**

Unipolar cell division in the yeast *S. cerevisiae* leads to filamentous growth: regulation by starvation and RAS. *Cell* 68: 1077-1090

**Greenspan, D. (1994).**

Treatment of oropharyngeal candidiasis in HIV-positive patients. *J. Am. Acad. Dermatol.* 31: S51-S55

**Gröbl, S. (2000).**

Isolierung und Charakterisierung eines Phosphatidylinositol-Kinase homologen Gens der humanpathogenen Hefe *Candida albicans*. Diplomarbeit, FSU Jena

**Härtl, A., Hillesheim, H.G., Künkel, W., und E.J. Schrinner (1995).**

Das *Candida*-infizierte Hühnerei: Ein alternatives Testsystem zum nachweis systemischer Anticandida-Wirkung. *Arzneim.-Forsch.* 45: 926-928

**Hama, H., E.A. Schnieders, J. Thorner, J. Y. Takemoto, und D.B. DeWald (1999).**

Direct involvement of phosphatidylinositol 4-phosphate in secretion in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 274: 34294-34300

**Hasilik,A., und W. Tanner (1978).**

Biosynthesis of the vacuolar yeast glycoprotein carboxypeptidase Y. Conversion of precursor into enzyme. Eur. J. Biochem. 85: 599-608

**Heitman, J., N.R. Movva, und M.N. Hall (1991).**

Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. Science 253: 905-909

**Helliwell, S.B., I. Howald, N. Barbet, und M.N. Hall (1998).**

TOR2 is part of two related signaling pathways coordinating cell growth in *S. cerevisiae*. Genetics 148: 99-112

**Hemmings, B.A., G.S. Zubenko, A. Hasilik, und E.W. Jones (1981).**

Mutant defective in processing of an enzyme located in the lysosome-like vacuole of *Saccharomyces cerevisiae*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 435-439

**Hendriks, L., A. Goris, Y. Van de Peer, J.M. Neefs, M. Vancanneyt, K. Kersters, G.L. Hennebert, und R. de Wachter (1991).**

Phylogenetic analysis of five medically important species as deduced from the basis of small ribosomal subunit RNA sequences. J. Gen. Microbiol. 137: 1223-1230

**Herman, P.K., und S.D. Emr (1990).**

Characterization of *VPS34*, a gene required for vacuolar protein sorting and vacuole segregation in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol. Cell. Biol. 10: 6742-6754

**Herman, P.K., J.H. Stack, J.A. DeModena, und S.D. Emr (1991).**

A novel protein kinase homolog essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. Cell 64: 425-437

**Hoffmann, C.S., und F. Winston (1987).**

A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. Gene 57: 267-272

**Hong, Z., und D.P.S. Verma (1994).**

A phosphatidylinositol 3-kinase is induced during soybean nodule organogenesis and is associated with membrane proliferation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 9617-9621

**Hostetter, M.K. (1996).**

Adhesion and morphogenesis in *Candida albicans*. Pediatric Res.39: 569-573

**Hoyer, L.L., S. Scherer, A.R. Shatzman, und G.P. Livi (1995).**

*Candida albicans ALS1*:domains related to a *Saccharomyces cerevisiae* sexual agglutinin seperated by a repeating motif. Mol. Microbiol. 15: 39-54

**Hoyer, L.L., T.L. Payne, und J.E. Hecht (1998a).**

Identification of *Candida albicans* *ALS2* and *ALS4* and localization of Als proteins to the fungal cell wall. *J. Bacteriol.* 180: 5334-5343

**Hoyer, L.L., T.L. Payne, M. Bell, A.M. Myers, und S. Scherer (1998b).**

*Candida albicans* *ALS3* and insights into the nature of the ALS gene family. *Curr. Genet.* 33: 451-459

**Hube, B., M. Monod, D.A. Schofield, A.J.P. Brown, und N.A.R. Gow (1994).**

Expression of seven members of the gene family encoding secretory aspartyl proteinases in *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 14: 87-99

**Hube, B., D. Sanglard, F.C. Odds, D. Hess, M. Monod, W. Schäfer, A.J.P. Brown, und N.A.R. Gow (1997).**

Disruption of each of the secreted aspartyl proteinase genes, *SAP1*, *SAP2*, and *SAP3* of *C. albicans* attenuates virulence. *Infect. Immun.* 65: 3529-3538

**Hull, C.M., und A.J. Johnson (1999).**

Identification of a Mating-Type-Like Locus in the Asexual Yeast *Candida albicans*. *Science* 285: 1271-1275

**Ibrahim, A.S., F. Mirbod, S.G. Filler, Y. Banno, G.T. Cole, Y. Kitajima, J. E. Edwards, Jr., Y. Nozawa, und M.A. Ghannoum (1995).**

Evidence implicating phospholipase as a virulence factor of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 63: 1993-1998

**Ishii, N., M. Yamamoto, H. Lahm, S. Iumi, F. Yoshihara, M. Arisawa, und Y. Aoki (1997).**

A DNA-binding protein from *Candida albicans* that binds to the RPG-box of *Saccharomyces cerevisiae* and the telomeric repeat sequence of *C. albicans*. *Microbiology* 143:417-427

**Janbon, G., F. Sherman, und E. Rutschenko (1998).**

Monosomy of a specific chromosome determines L-sorbose utilization: a novel regulatory mechanism in *Candida albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 5150-5155

**Jones, S.M., J.G. Alb Jr., S.E. Phillips, V.A. Bankaitis, und K.E. Howell (1998).**

A phosphatidylinositol 3-kinase and a phosphatidylinositol transfer protein act synergistically in formation of constitutive transport vesicles from the trans-Golgi network. *J. Biol. Chem.* 273: 10349-10354

**Kauffmann-Zeh, A., G.M. Thomas, A. Ball, S. Prosser, E. Cunningham, S. Cockcroft, und J.J. Hsuan (1995).**

Requirement for phosphatidylinositol transfer protein in epidermal growth factor signaling. *Science* 268: 1188-1190



**Kearns, B.G., T.P. McGee, P. Mayinger, A. Gedvilaite, S.E. Phillips, S. Kagiwada, und V.A. Bankaitis (1997).**

Essential role of diacylglycerol in protein transport from the yeast Golgi complex. *Nature* 387: 101-105

**Kennedy, M.J. , A.L. Rogers, L.R. Hanselman, D.R. Soll, und R.J. Yancey (1988).**

Variation in adhesion and cell surface hydrophobicity in *Candida albicans* white and opaque phenotype. *Mycopath.* 102:24-31

**Kiel, J.A.K.W., K.B. Rechinger, I.J. Van der Klei, F.A. Salomons, V.I. Titorenko, und M. Veenhuis (1999).**

The *Hansenula polymorpha* PDD1 Gene Product, Essential for the Selective Degradation of Peroxisomes, is a Homologue of *Saccharomyces cerevisiae* Vps34p. *Yeast* 15: 741-754

**Kimura, K., S. Miyake, M. Makuuchi, R. Morita, T. Usui, M. Yoshida, S. Horinouchi, und Y. Fukui (1995).**

Phosphatidylinositol 3-kinase in fission yeast: a possible role in stress responses. *Biosci. Biotech. Biochem.* 59: 678-682

**Klionsky, D.J., P.K. Herman, und S.D. Emr (1990).**

The fungal vacuole: composition, function, and biogenesis. *Microbiol. Rev.* 54:266-292.

**Klotz, S., R. Heni, R. Smith, und J. Rous (1994).**

The fibronectin adhesin of *Candida albicans*. *Infect. Immun.* 62: 4679-4681

**Köhler, J.R., und G.R. Fink (1996).**

*Candida albicans* strains heterozygous and homozygous for mutations in mitogen-activated protein kinase signaling components have defects in hyphal development. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13223-13228

**Kolotila, M.P., und R.D. Diamond (1990).**

Effects of neutrophils and in vitro oxidants on survival and phenotypic switching of *Candida albicans* WO-1. *Infect. Immun.* 58: 1174-1179

**Kurtz, M.B., M.W. Cortelyou, und D.R. Kirsch (1986).**

Integrative transformation of *C. albicans* , using a cloned *Candida ADE2* gene. *Mol. Cell. Biol.* 6: 142-149

**Kvaal, C.A., T. Srikantha, und D.R. Soll (1997).**

Misexpression of the white-phase-specific gene *WH11* in the opaque phase of *Candida albicans* affects switching and virulence. *Infect. Immun.* 65: 4468-4475

**Lämmli, U.K. (1970).**

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685

**Lay, J., L.K. Henry, J. Clifford, Y. Koltin, C.E. Bulawa, und J.M. Becker (1998).**

Altered Expression of Selectable marker *URA3* in Gene-Disrupted *C. albicans* Strains Complicates Interpretation of Virulence Studies. *Infect. Immun.* 66:5301-5306

**Leberer, E., D. Marcus, I.D. Broadbent, K.L. Clark, D. Dignard, K. Ziegler, A. Schmidt, N.A.R. Gow, A.J.P. Brown, und D.Y. Thomas (1996).**

Signal transduction through homologs of Ste20p and Ste7p can trigger hyphal formation in the pathogenic fungus *C. albicans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 13217-13222

**Leidich, S.D., A.S. Ibrahim, Y. Fu, A. Koul, C. Jessup, J. Vitullo, W. Fonzi, F. Mirbod, S. Nakashima, Y. Nozawa, und M.A. Ghannoum (1998).**

Cloning and Disruption of *caPLB1*, a Phospholipase B Gene Involved in the Pathogenicity of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 273: 26078-26086

**Leuker, C.E., und J.F. Ernst (1994).**

Toxicity of a heterologous leucyl-tRNA (anticodon CAG) in the pathogen *Candida albicans* : *in vivo* evidence for non-standard decoding of CUG-codons. *Mol. Gen. Genet.* 245: 212-217

**Li, R.K., und J.E. Cutler (1994).**

Chemical definition of an epitope/adhesin molecule on *C. albicans*. *J. Biol. Chem.* 268: 18293-18299

**Linassier, C., L.K. McDougall, J. Domin, und M.D. Waterfield (1997).**

Molecular cloning and biochemical characterization of a *Drosophila* phosphatidylinositol-specific phosphoinositide 3-kinase. *Biochem. J.* 321: 849-856

**Liu, H., J. Köhler, und G.R. Fink (1994).**

Suppression of hyphal formation in *C. albicans* by mutation of a Ste12 homolog. *Science.* 266: 1723-1726

**Lloyd, A.T., und P.M. Sharp (1992).**

Evolution of codon usage patterns: the extent and nature of divergence between *C. albicans* and *S. cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* 20: 5289-5295

**Lo, H.-J., J.R. Köhler, B. DiDomenico, D. Loebenberg, A. Cacciapuoti, und G.R. Fink (1997).**

Nonfilamentous *C. albicans* mutants are avirulent. *Cell* 90: 939-949.

**Lopez, M.C., J.-M. Niceaud, H.B. Skinner, C. Vergnolle, J.C. Kader, V. Bankaitis, und J.C. Gaillardin (1994).**

A phosphatidylinositol/phosphatidylcholine transfer protein is required for differentiation of the dimorphic yeast *Yarrowia lipolytica* from the yeast to the mycelial form. *J. Cell Biol.* 124: 113-127

- Lopez-Illasaca, M., P. Crespo, P.G. Gutkind, and R. Wetzker (1997).** Linkage of G-protein coupled receptors to the MAPK signaling pathway through PI3-kinase gamma. *Science* 17: 394-397
- Losberger, C., und J.F. Ernst (1989).**  
Sequence of the *C. albicans* gene encoding actin. *Nucleic Acids Res.* 17: 9488
- Lowry, O.H., N.J. Roseborough, A.L. Farr, und R.J. Randall (1951).**  
Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193: 265-275
- Madhani, H.D., und G.R. Fink (1998).**  
The control of filamentous differentiation and virulence in fungi. *Trends Cell Biol.* 8: 348-353
- Magee, B.B., B. Hube, R.J. Wright, P.J. Sullivan, und P.T. Magee (1993).**  
The genes encoding the secreted aspartyl proteinases of *Candida albicans* constitute a family with at least three members. *Infect. Immun.* 61: 3240-3243
- Mao, Y., V.F. Kalb, und B. Wong (1999).**  
Overexpression of a dominant-negative allele of *SEC4* inhibits growth and protein secretion in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 7235-7242
- Matthews, R.C. (1994).**  
Pathogenicity determinants of *Candida albicans*: potential targets for immunotherapy? *Microbiol.* 140: 1505-1511
- McCullough, M.J., B.C. Ross, und P.C. Reade (1996).**  
*Candida albicans*: a review of its history, taxonomy, epidemiology, virulence attributes, and methods of strain differentiation. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.* 25: 136-144
- Meaden, P.G., N. Arneborg, L.U. Guldfieldt, H. Siegumfeldt, und M. Jakobsen (1999).**  
Endocytosis and vacuolar morphology in *Saccharomyces cerevisiae* are altered in response to ethanol stress or heat shock. *Yeast* 15: 1211-1222
- Molendijk, A.M., und R.F. Irvine (1998).**  
Inositide signalling in *Chlamydomonas*: characterization of a phosphatidylinositol 3-kinase gene. *Plant Mol. Biol.* 37: 53-66
- Molloy, C., R.D. Cannon, P.A. Sullivan, und M.G. Shepherd (1994).**  
Purification and characterization of two forms of N-Acetylglucosaminidase from *Candida albicans* showing widely different outer chain glycosylation. *Microbiology* 140: 1543-1553
- Monteoliva, L., M. Sanchez, J. Pla, C. Gil, und C. Nombella (1996).**  
Cloning of *Candida albicans* *SEC14* gene homologue coding for a putative essential function. *Yeast* 12: 1097-1105

**Morrow, B., T. Srikantha, und D.R. Soll (1992).**

Transcription for the gene for a pepsinogen, *PEP1*, is regulated by white-opaque switching in *Candida albicans*. Mol. Cell. Biol. 12: 2997-3005

**Morschhäuser, J., G. Blum-Oehler, und J. Hacker (1997).**

Virulenz- und Resistenzmechanismen pathogener *Candida*-Spezies. Med. Welt 48: 352-357

**Mukhtar, M., D.A. Logan, und N. Käufer (1992).**

The carboxypeptidase Y-encoding gene from *Candida albicans* and its transcription during yeast-to hyphae conversion. Gene 121: 173-177

**Müller, F.-M.C., J. Morschhäuser, G. Köhler, W. Ziebuhr, und J. Hacker (1999).**

Adhärenz und Invasion: Zwei Pathogenitätsfaktoren bei pathogenen Bakterien und Pilzen. Mycoses 42: 39-42

**Mullis, K.B., und F.A. Fallona (1987).**

Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. Meth. Enzym. 155: 335-350

**Munn, A.L., und H. Riezman (1994).**

Endocytosis is required for the growth of vacuolar H<sup>+</sup>-ATPase-defective yeast: identification of six new *END* genes. J. Cell Biol. 127: 373-386

**Murray, V. (1989).**

Improved double-stranded DNA-sequencing using the linear polymerase chain reaction. Nucleic Acids Res. 17: 8889

**Odds, F.C. (1988).**

*Candida* and candidosis. A review and bibliography, 2nd ed. Bailliere-Tindall, London, United Kingdom.

**Odds, F.C. (1994).**

Pathogenesis of *Candida* infections. J. Am. Acad. Dermatol. 31: S2-S5

**Odorizzi, G., M. Babst, und S.D. Emr (1998).**

Fab1p PI(3)P 5-kinase function essential for protein sorting in the multivesicular body. Cell 95: 847-858

**Perfect, J.R. (1996).**

Fungal virulence genes as targets for antifungal chemotherapy. Antimicrob. Agent. Chemother. 40: 1577-1583

**Peterson, M.R., C.G. Burd, und S.D. Emr (1999).**

Vac1p coordinates Rab and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in Vps45p-dependent vesicle-docking/fusion at the endosome. Curr. Biol. 9: 159-162

**Peto, R., M.C. Pike, P. Armitage, N.E. Breslow, D.R. Cox, S.V. Howard, N. Mantel, K. McPherson, J. Peto, und P.G. Smith (1977)..**

Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. analysis and examples. Br. J. Cancer 35: 1-39

**Pfaller, M.A. (1996).**

Nosocomial candidiasis: emerging species, reservoirs, and modes of transmission. Clin. Infect. Dis. 22: 89-94

**Piper, R.C., A.A. Cooper, H. Yang, und T.H. Stevens ((1995).**

VPS27 controls vacuolar endocytic traffic through a prevacuolar compartment in *S. cerevisiae*. J. Cell Biol. 131: 603-617

**Pla, J., L. Monteoliva, F. Navarro-Garcia, M. Sanchez, und C. Nombela (1996).**

Understanding *C. albicans* at the Molecular Level. Yeast 12: 1677-1702

**Pringle, J.R., J.R. Broach, und E.W. Jones (Herausgeber)(1997).**

The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Cell cycle and cell biology. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Riggle, P.A., K.A. Andrutis, X. Chen, S.R. Tzipori, und C.A. Kumamoto (1999).**

Invasive lesions containing filamentous forms produced by a *Candida albicans* mutant that is defective in filamentous growth in culture. Infect. Immun. 67: 3649-3652

**Robertson, L.S., und G.R. Fink (1998).**

The three yeast A kinases have specific signaling functions in pseudohyphal growth. Proc. Natl. Acad. Sci. 95: 13783-13787

**Riggsby, W.S., L.J. Torres-Bauza, J.W.Wills, und T.M.. Townes (1982).**

DNA content, kinetic complexity, and the ploidy question in *Candida albicans*. Mol. Cell. Biol. 2: 853-862

**Robinson, J.S., D.J. Klionsky, L.M. Banta, und S.D. Emr (1988).**

Protein sorting in *S. cerevisiae*: isolation of mutants defective in the delivery and processing of multiple vacuolar hydrolases. Mol. Cell. Biol. 8: 4936-4948

**Rose, M.D., P. Novick, J.H. Thomas, D. Botstein, und G.R. Fink (1987).**

A *S. cerevisiae* genomic plasmid bank based on a centromere-containing shuttle vector. Gene 60: 237-243

**Rothman, J.H., und T.H. Stevens (1986).**

Protein sorting in yeast: mutants defective in vacuole biogenesis mislocalize vacuolar proteins into the late secretory pathway. Cell 47: 1041-1051

**Rutschenko-Bulgac, E.P., D. Howard, und F. Sherman (1994).**

Chromosomal alterations of *Candida albicans* are associated with the gain and loss of assimilating functions. J. Bacteriol. 176: 3231-3241

**Salminen, A., und J.P. Novick (1987).**

A Ras-like protein is required for a post-Golgi event in yeast secretion. Cell 49: 527-538

**Sambrook, J., E.F. Fritsch, und T. Maniatis (Herausgeber) (1989).**

Molecular cloning: a laboratory manual, 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.

**Sanger, F., S. Nicklen, und A.R. Coulson (1977).**

DNA sequencing with chain terminating inhibitors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74: 5463-5467

**Santos, M.A.S., und M.F. Tuite (1995).**

The CUG codon is decoded *in vivo* as serine and not leucine in *Candida albicans*. Nucleic Acids Res. 23: 1481-1486

**Schaller, M. , H.C. Korting, W. Schaäfer, J. Bastert, W. Chen, und B. Hube (1999a).**

Secreted aspartic proteinase (Sap) activity contributes to tissue damage in a model of human oral candidosis. Mol. Microbiol. 34: 169-180

**Schaller, M., B. Hube, M.W. Ollert, W. Schäfer, M. Borg-von Zepelin, E. Thoma-Greber, und H.C. Korting (1999b).**

*In vivo* expression and localization of *Candida albicans* secreted aspartyl proteinases during oral candidiasis in HIV-infected patients. J. Invest. Dermatol. 112: 383-386

**Scherer, S., P.T. Magee (1990).**

Genetics of *C. albicans*. Microbiol. Rev. 54: 226-241

**Schiestl, R.H., und R.D. Gietz (1989).**

High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. Curr. Genet. 16: 339-346

**Schmidt, A., J.Kunz, und M.N. Hall (1996).**

*TOR2* is required for organization of the actin cytoskeleton in yeast. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 13780-13805

**Schmidt, A., M. Bickle, T. Beck, und M.N. Hall (1997).**

The yeast phosphatidylinositol kinase homolog *TOR2* activates *RHO1* and *RHO2* via the exchange factor *ROM2*. Cell 88: 531-542

**Schu, P.V., K. Takegawa, M.J. Fry, J.H. Stack, M.D. Waterfield, und S.D. Emr (1993).**

Phosphatidylinositol 3-kinase encoded by yeast *VPS34* gene essential for protein sorting. *Science* 260: 88-91

**Shepherd, M.G. (1988).**

Morphogenetic transformation of fungi. *Curr. Top. Med. Mycol.* 2: 278-304

**Shikegawa, K. und W.J. Dower (1988).**

Electroporation of eukaryotes and prokaryotes: A general approach to the introduction of macromolecules into cells. *BioTechniques* 6: 742-751

**Siddhanta, U., J. McIlroy, A. Shah, Y. Zhang, und J. M. Backer (1998).**

Distinct roles for the p110 $\alpha$  and hVPS34 phosphatidylinositol 3-kinases in vesicular trafficking, regulation of the actin cytoskeleton, and mitogenesis. *J. Cell Biol.* 143: 1647-1659

**Singer-Krüger, B., R. Frank, F. Crausaz, und H. Riezman (1993).**

Partial purification and characterization of early and late endosomes from yeast. Identification of four novel proteins. *J. Biol. Chem.* 268: 14376-14386

**Slutsky, B., M. Staebell, J. Anderson, L. Risen, M. Pfaller, und D.R. Soll (1987).**

'White-opaque transition': a second high-frequency switching system in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 169: 189-197

**Soll, D.R. (1992).**

High-Frequency Switching in *Candida albicans*. *Clin. Microbiol. Rev.* 15: 183-203

**Soll, D.R., B. Morrow, und T. Srikantha (1993).**

Review: High-frequency phenotypic switching. *Trends in Genetics* 9: 61-65

**Sonneborn, A., D.P. Bockmühl, M. Gerads, K. Kurpanek, D. Sanglard, und J.F. Ernst (2000).**

Protein Kinase A encoded by *TPK2* regulates dimorphism of *Candida albicans*. *Mol. Microbiol.* 35: 386-396

**Southern, E.M. (1975).**

Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. *J. Mol. Biol.* 98: 503-528

**Staab, F., C. A. Ferrer, und P. Sundstrom (1996).**

Developmental expression of a tandemly repeated, proline- and glutamine-rich amino acid motif on hyphal surfaces of *Candida albicans*. *J. Biol. Chem.* 271: 6298-6305

**Staab, J.F., S.D. Bradway, P.L. Fidel, und P. Sundstrom (1999).**

Adhesive and mammalian transglutaminase substrate of *Candida albicans* Hwp1. *Science* 283: 1535-1537

**Stack, J.H., P.K. Herman, P.V. Schu, und S.D. Emr (1993).**

A membrane-associated complex containing the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI 3-kinase is essential for protein sorting to the yeast lysosome-like vacuole. *EMBO J.* 12: 2195-2204

**Stack, J.H., und S.D. Emr (1994).**

Vps34p required for yeast vacuolar protein sorting is a multiple specificity kinase that exhibits both protein kinase and phosphatidylinositol-specific PI3-kinase activities. *J. Biol. Chem.* 269: 31552-31562

**Stack, J.H., D.B. DeWald, K. Takegawa, und S.D. Emr (1995).**

Vesicle-mediated protein transport: regulatory interactions between the Vps15 protein kinase and the Vps34 PI3-kinase essential for protein sorting to the vacuole in yeast. *J. Cell Biol.* 129: 321-334

**Stephens, L.R., K.T. Hughes, und R.F. Irvine (1991).**

Pathway of phosphatidylinositol(3,4,5)-trisphosphate synthesis in activated neutrophils. *Nature* 51: 33-39

**Stoldt, V.R., A. Sonneborn, C.E. Leuker, und J.F. Ernst (1997).**

Efg1p, an essential regulator of morphogenesis of the human pathogen *C. albicans*, is a member of a conserved class of bHLH proteins regulating morphogenetic processes in fungi. *EMBO J.* 16: 1982-1991

**Stoyanova, S., G. Bulgarelli-Leva, C. Kirsch, T. Hanck, R. Klinger, R. Wetzker, und M.P. Wymann (1997).**

Lipid kinase and protein kinase activities of G-protein-coupled phosphoinositide 3-kinase: structure-activity analysis and interactions with wortmannin. *Biochem. J.* 324: 489-495

**Stoyanov, B., S. Volinia, T. Hanck, I. Rubio, M. Loubtchenkov, D. Malek, S. Stoyanova, B. Vanhaesebroeck, R. Dhand, B. Nurnberg, P. Gierschik, K. Seedorf, J. J. Hsuan, M.D. Waterfield, und R. Wetzker (1995)**

Cloning and characterization of a G-protein-activated human phosphoinositide-3 kinase. *Science* 269: 690-693

**Sundstrom, P. (1999).**

Adhesins in *Candida albicans*. *Curr. Opin. Microbiol.* 2: 353-357

**Sweet, S.P., und L.J. Douglas (1991).**

Effect of iron deprivation on surface composition and virulence determinants of *Candida albicans*. *J. Gen. Microbiol.* 137: 859-856



**Takegawa, K., D.B. DeWald, und S.D. Emr (1995).**

*Schizosaccharomyces pombe* Vps34p, a phosphatidylinositol-specific PI3-kinase essential for normal cell growth and vacuole morphology. *J. Cell Science* 108: 3745-3756

**Thimon, L., F. Peypoux, J. Wallach, und G. Michel (1995).**

Effect of the lipopeptide antibiotic, iturin A, on morphology and membrane ultrastructure of yeast cells. *FEMS Microbiol. Lett.* 128: 101-106

**Timpel, C., S. Strahl-Bohlsinger, K. Ziegelbauer, und J.F. Ernst (1998).**

Multiple functions of Pmt1p-mediated O-mannosylation in the fungal pathogen *C. albicans*. *J. Biol. Chem.* 273: 20837-20846

**Toker, A., und L.C. Cantley (1997).**

Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676

**Tosh, F.D., und L.J. Douglas (1992).**

Characterization of a fucose-binding adhesin of *C. albicans*. *Infect Immun.* 60: 4734-4739

**Tuite, M.F.(1996).**

Discovery and development of new systemic antifungals. *Trends Biotechnol.* 14: 219-220

**van den Hazel, H.B., M.C. Kielland-Brandt, und J.R. Winther (1996).**

Review: Biosynthesis and function of yeast vacuolar proteases. *Yeast* 12: 1-16

**Vanhaesebroeck, B., S.J. Leever, G. Panayotou, und M.D. Waterfield (1997).**

Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22: 267-272

**Vanhaesebroeck, B., und M.D. Waterfield (1999).**

Signaling by distinct classes of phosphoinositide 3-kinases. *Exp. Cell Res.* 253: 239-254

**Vanhaesebroeck, B., K. Higashi, C. Raven, M. Welham, S. Anderson, P. Brennan, S.G. Ward, und M.D. Waterfield (1999).**

Autophosphorylation of p110 $\delta$  phosphoinositide 3-kinase: a new paradigm for the regulation of lipid kinases *in vitro* and *in vivo*. *EMBO J.* 18: 1292-1302

**Vazquez-Torres, A., und E. Balish (1997).**

Macrophages in resistance to candidiasis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 61: 170-192

**Vida, T.A., und S.D. Emr (1995).**

A new vital stain for visualizing vacuolar membrane dynamics and endocytosis in yeast. *J. Cell Biol.* 128: 779-792

**Volinia, S., R. Dhand, B. Vanhaesebroeck, L.K. MacDougall, R. Stein, M.J. Zvelebil, J. Domin, C. Panaretou, und M.D. Waterfield (1995).**

A human phosphatidylinositol 3-kinase complex related to the yeast Vps34p-Vps15p protein sorting system. *EMBO J.* 14: 3339-3348

- Walker, E.H., O. Perissic, C. Ried, L. Stephens, and R.L. Williams (1999).**  
Structural insights into phosphoinositide 3-kinase catalysis and signalling. *Nature* 402: 312-320
- Walsh, J.P., K.K. Caldwell, and P.W. Majerus (1991).**  
Formation of phosphatidylinositol 3-phosphate by isomerization from phosphatidylinositol 4-phosphate. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 9184-9187
- Watts, H.J., F.S. Cheah, B. Hube, D. Sanglard, and N.A.R. Gow (1998).**  
Altered adherence in strains of *Candida albicans* harbouring null mutations in secreted aspartic proteinase genes. *FEMS Microbiol. Lett.* 159: 129-135
- Weber, H. (1979).**  
Substructural studies on sporulation of *Saccharomycopsis lipolytica*. *Z. Allgem. Mikrobiol.* 19: 283-297
- Welters, P., K. Takegawa, S.D. Emr, and M.J. Chrispeels (1994).**  
*AtVPS34*, a phosphatidylinositol 3-kinase of *Arabidopsis thaliana*, is an essential protein with homology to a calcium-dependent lipid binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91: 11398-11402
- Wendland, B., J.M. McCaffery, Q. Xiao, and S.D. Emr (1996).**  
A novel fluorescence-activated cell-sorter-based screen for yeast endocytic mutants identifies a yeast homologue of mammalian Eps15. *J. Cell. Biol.* 135: 1485-1500
- Whelan, W.L., and P.T. Magee (1981).**  
Natural heterozygosity in *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 145: 896-903
- Whelan, W.L., and D.R. Soll (1982).**  
Mitotic recombination in *Candida albicans*: recessive lethal alleles linked to a gene required for methionine biosynthesis. *Mol. Gen. Genet.* 187: 477-485
- Woolford, C.A., L.B. Daniels, F.J. Park, E.W. Jones, J.N. VanArsdell, and M.A. Innis (1986).**  
The *PEP4* gene encodes an aspartyl protease implicated in the posttranslational regulation of *S. cerevisiae* vacuolar hydrolases. *Mol. Cell. Biol.* 6: 2500-2510
- Wurmser, A.E., and S.D. Emr (1998).**  
Phosphoinositide signaling and turnover: PI(3)P, a regulator of membrane traffic, is transported to the vacuole and degraded by a process that requires luminal vacuolar hydrolase activities. *EMBO J.* 17: 4930-4942
- Wurmser, A.E., J.D. Gary, and S.D. Emr (1999).**  
Phosphoinositide 3-Kinases and Their FYVE Domain-containing Effectors as Regulators of Vacuolar/Lysosomal membrane Trafficking Pathways. *J. Biol. Chem.* 14: 3129-3132

**Wymann, M.P., G. Bulgarelli-Leva, M.J. Zvelebil, L. Pirola, B. Vanhaesebroeck, M.D. Waterfield, and G. Panayotou (1996).**

Wortmannin inactivates phosphoinositide 3-kinase by covalent modification of lys-802, a residue involved in the phosphate transfer reaction. *Mol. Cell. Biol.* 16: 1722-1733

**Wymann, M.P., and L. Pirola (1998).**

Structure and function of phosphoinositide 3-kinases. *Biochim. Biophys. Acta* 1436: 127-150

**Yaar, L., M. Mevarech, and Y. Koltin (1997).**

A *Candida albicans* RAS-related gene (*CaRAS1*) is involved in budding, cell morphogenesis and hypha development. *Microbiology* 143: 3033-3044

**Yamada-Okabe, T., T. Mio, N. Ono, Y. Kashima, M. Matsui, M. Arisawa, and H. Yamada-Okabe (1999).**

Roles of three histidine kinase genes in hyphal development of the pathogenic fungus *Candida albicans*. *J. Bacteriol.* 181: 7243-7247

**Yamamoto, A., D.B. DeWald, I.V. Boronenkov, R.A. Anderson, S.D. Emr, and D. Koshland (1995).**

Novel PI(4)P 5-Kinase Homologue, Fab1p, Essential for Normal Vacuole Function and Morphology. *Mol. Biol. Cell* 6: 525-539

**Yan, S., R.G. Rodrigues, D. Cahn-Hidalgo, T.J. Walsh, and D.D. Roberts (1998).**

Hemoglobin induces binding of several extracellular matrix proteins to *C. albicans*. *J. Biol. Chem.* 273: 5638-5644

**Yanisch-Perron, C., J. Vieira, and J. Messing (1985).**

Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33: 103-119

**Zhou, K., K. Takegawa, S.D. Emr, and R.A. Firtel (1995).**

A phosphatidylinositol (PI) kinase gene family in *Dictyostelium discoideum*: Biological roles of putative mammalian p110 and yeast Vps34p PI 3-kinase homologs during growth and development. *Mol. Cell. Biol.* 15: 5645-5656

**Zvelebil, M.J., L. MacDougall, S. Leever, S. Volinia, B. Vanhaesebroeck, I. Gout, G. Panayotou, J. Domin, R. Stein, F. Pages, H. Koga, K. Salim, J. Linacre, P. Das, C. Panaretou, R. Wetzker, and M. Waterfield (1996).**

Structural and functional diversity of phosphoinositide 3-kinases. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B* 351: 217-223

# Abkürzungsverzeichnis

APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
BSA	Rinderserumalbumin (Bovine Serum Albumin)
BTPNA	N-Benzoyl-L-tyrosin- <i>p</i> -Nitroanilid
bp	Basenpaare
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CMAC	7-amino-4-chloromethylcumarin
CPY	Carboxypeptidase Y
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	2',3'-Didesoxynukleosidtriphosphat
DEPC	Diethylpyrocarbonat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DIC	Differentieller Interferenzkontrast
DMF	Dimethylformamid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DTE	Dithioerythritol
DTT	Dithithreitol
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
ECM	Extrazelluläre Matrix
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylenglycol-bis( $\beta$ -aminoethylether)N,N,N',N'-tetraessigsäure
ELMI	Elektronenmikroskop(ie)
FCS	Fötales Kälberserum
FOA	5-Fluoroorotsäure
HEPES	N-2-hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
HisTag	Polyhistidinpeptid (6 $\times$ His)
HRP	Meerrettich-Peroxidase (Horseradish-Peroxidase)
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IPTG	1-Isopropyl- $\beta$ -D-1-thiogalactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
$\lambda_{\text{exc}}$	Anregungswellenlänge

$\lambda_{em}$	Emissionswellenlänge
Mbp	Megabasenpaare
MetOH	Methanol
MOPS	Morpholinopropansulfonsäure
mRNA	Messenger-RNA
NTA	Nitrilotriessigsäure
OD <sub>600</sub>	optische Dichte bei einer Wellenlänge von $\lambda=600$ nm
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PEG	Polyethylenglykol
PI	Phosphatidylinositol
PI3P	Phosphatidylinositol3-Phosphat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute
rRNA	ribosomale RNA
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumdodecylsulfat
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethyldiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminoethan
tRNA	Transfer-RNA
U	Einheit (Unit)
X-Gal	5-Brom-4-chlor-3-indolyl- $\beta$ -D-galactopyranosid
YNB	Yeast Nitrogen Base (Hefe-Stickstoff-Basis)

# Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Hans-Knöll-Institut für Naturstoff-Forschung e.V., Jena in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie des Klinikums der FSU Jena angefertigt. Die Förderung erfolgte zum großen Teil durch die DFG im Rahmen des Projektes "Klonierung und Charakterisierung von neuen Phosphatidylinositol3-Kinasen aus *Candida albicans*" (Dr. R. Eck, Prof. Dr. R. Wetzker).

Herrn Prof. Dr. A. Hinnen möchte ich für seine Bereitschaft, meine Arbeit zu unterstützen und die Betreuung zu übernehmen, danken.

Bei Herrn Prof. Dr. W. Künkel bedanke ich mich herzlich für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe Mykologie des HKI und die stetige Unterstützung meiner Arbeit.

Herrn Prof. Dr. R. Wetzker danke ich ganz herzlich für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit sowie für die Möglichkeit, einen Teil der Arbeiten in seiner Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie durchzuführen.

Meinen besonderen Dank möchte ich Dr. Raimund Eck für seine engagierte Betreuung und Unterstützung sowie seine ständige Diskussions- und Hilfsbereitschaft aussprechen.

Ein herzliches Dankeschön gilt Erika Franzl für die technische Unterstützung, vor allem bei den ELMI-Präparationen, den Komplementationsversuchen und bei der Untersuchung der Mäusenieren. Ganz herzlicher Dank gebührt auch Andrea Hartmann, insbesondere für die Durchführung der Proteinexpression im Fermenter und die Aufreinigung des Proteins sowie für die Hilfe bei der Fluoreszenzmikroskopie und den Adhäsionstests. Monika Nguyen und Katrin Beer danke ich besonders für ihre stete Hilfsbereitschaft und die freundliche Arbeitsatmosphäre. Ein Dankeschön geht auch an Dr. Clemens Bergmann für die Bereitstellung des Plasmids pYES2G sowie viele hilfreiche Ratschläge. Den Mitgliedern der Arbeitsgruppe Molekulare Zellbiologie Dr. Ignacio Rubio und Regina Heinze danke ich für die Proben der humanen PI3-Kinase  $\gamma$  sowie für hilfreiche Ratschläge und Diskussionen; und auch Ute Wittig sei für ihre Hilfsbereitschaft gedankt. Bei allen anderen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Mykologie und Molekulare Zellbiologie möchte ich mich ebenfalls für das angenehme Arbeitsklima bedanken. Herrn Dr. A. Härtl aus der Abteilung Wirkstoffprüfung des HKI und seinen Assistentinnen Frau Freis, Frau Stöckl und Frau Weber bin ich für die Durchführung der Tierversuche zu Dank verpflichtet. Herrn Dr. K. Augsten und Frau Hermann vom IMB Jena möchte ich für die ELMI-Aufnahmen danken. Herrn R. Schorcht und Herrn E. Tittelbach danke ich für die Hilfe bei Problemen mit den Institutscomputern.

In meinen Dank einschließen möchte ich auch meine Eltern, die mich immer auf meinem Weg bestärkt haben. Nicht zuletzt möchte ich meinem Mann Falk für sein Verständnis und seinen Zuspruch sowie für die umfangreiche Hilfe am Computer und die Durchsicht des Manuskripts danken.

# Selbständigkeitserklärung

Ich erkläre, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und nur unter Verwendung der angegebenen Hilfsmittel und Literatur angefertigt habe.

A handwritten signature in black ink, reading "Astrid Bruchmann". The signature is written in a cursive style with a long horizontal stroke at the end.